

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**Mgr. Tomáš Petr**

**Změny ve složení a lokalizaci gangliosidů u cholestázy v návaznosti na jiné markery  
signalizující patologické procesy v jaterních buňkách**

Changes in the composition and localization of gangliosides in cholestasis associated  
with other markers of pathological processes in hepatocytes

**Disertační práce**

Školitel: **MUDr. Lucie Muchová, PhD.**

Konzultant: **Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.**

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 25. 10. 2016

Tomáš Petr

PETR, Tomáš. *Změny ve složení a lokalizaci gangliosidů u cholestázy v návaznosti na jiné markery signalizující patologické procesy v jaterních buňkách. [Changes in the composition and location of gangliosides in cholestasis, in connection with pathological processes in hepatocytes]*. Praha, 2016. 187 s, 5 příloh. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce: Muchová Lucie. Konzultant: Šmíd František.

## Poděkování

Velice rád bych poděkoval své školitelce, MUDr. Lucii Muchové, PhD., za cenné rady, připomínky a podmínky, které mi vždy trpělivě a s maximálním úsilím poskytovala.

Samozřejmě také děkuji svému konzultantovi, Doc. RNDr. Františku Šmídovi, CSc., za odborné rady především v oblasti glykosfingolipidů a jejich metodického zpracování.

Velké díky patří také Prof. MUDr. Liboru Vítkovi, PhD., MBA za mnohačetné konzultace a vytvoření moderního a dynamického zázemí laboratoře, ve které tato práce mohla vzniknout.

Děkuji širokému kolektivu Centrálních výzkumných laboratoří ÚLBD 1. LF UK a VFN v Praze za milé a přátelské zázemí po celou dobu postgraduálního studia.

Děkuji rovněž nadaci „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“, Grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze (251207), Interní grantové agentuře ministerstva zdravotnictví České republiky (9366-3, 11327-4) a PRVOUK (P25/LF1/2) za finanční pomoc při zajištění tohoto projektu.

Především bych rád poděkoval své rodině a zejména manželce Jáře, dceři Stelince a synovi Bertíkovi za trpělivost a podporu během celého postgraduálního studia.



# Obsah

1. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	15
1.1. Úvod .....	15
1.2. Glykosfingolipidy .....	18
1.2.1. Struktura a názvosloví.....	18
1.2.2. Biosyntéza a katabolismus .....	23
1.2.3. Vlastnosti.....	30
1.3. Cholestáza.....	34
1.4. Fixace kryostatových řezů .....	41
1.5. Katabolická dráha hemu .....	44
2. CÍLE .....	50
2.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky choleratoxinu <i>in situ</i> .....	50
2.2. Vliv modulace HMOX na obsah a složení glykosfingolipidů v jaterní tkáni při cholestáze indukované estrogény .....	50
2.3. Změny ve složení a distribuci glykolipidů u obstrukční cholestázy.....	51
2.4. Vliv modulace HMOX na obstrukční cholestázu.....	51
3. METODICKÁ ČÁST .....	52
3.1. Materiál.....	52
3.2. Přístrojové vybavení .....	53
3.3. Chemikálie.....	54
3.4. Příprava používaných roztoků .....	56
3.5. Metodické postupy .....	58

3.5.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky cholera toxinu <i>in situ</i> .....	58
3.5.1.1. Kvantifikace ztrát GM1 gangliosidu během acetonové fixace .....	58
3.5.1.2. Stanovení gangliosidů po acetonové extrakci z lyofilizovaných homogenátů .....	60
3.5.1.3. Chromatografie gangliosidů na DEAE aneksu .....	61
3.5.1.4. Destrukce alkalilabilních fosfolipidů alkalickou metanolýzou, dialýza a lyofilizace .....	62
3.5.1.5. Přechištění gangliosidů na koloně silikagelu .....	62
3.5.1.6. Fotometrické stanovení celkových gangliosidů. ....	62
3.5.1.7. Histochemická detekce GM1 v játrech .....	63
3.5.1.8. Denzitometrická analýza GM1 gangliosidu .....	65
3.5.1.9. Stanovení GM1 v jaterní a mozkové tkáni .....	66
3.5.1.10. Stanovení cholesterolu .....	66
3.5.2. Vliv modulační aktivity HMOX na obsah a složení GSL v jaterní tkáni potkana po cholestáze indukované estrogény .....	67
3.5.2.1. Stanovení markerů jaterního poškození .....	67
3.5.2.2. Stanovení aktivity HMOX .....	67
3.5.2.3. Stanovení antioxidační kapacity séra .....	69
3.5.2.4. Analýza jaterních gangliosidů .....	69
3.5.2.5. TLC kvantifikace základních jaterních gangliosidů.....	70
3.5.2.6. Stanovení exprese glykosyltransferáz .....	71
3.5.5. Statistická analýza .....	71
4. VÝSLEDKY .....	72
4.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky cholera toxinu <i>in situ</i> .....	72

4.1.1. Vliv fixace na extrakci GM1 gangliosidu z jaterních řezů.....	72
4.1.2. Vliv acetonové fixace na extrakci gangliosidů ze suchých jaterních a mozkových homogenátů .....	74
4.1.3. Histochemická detekce GM1 gangliosidu na jaterních kryostatových řezech.....	74
4.1.4. Srovnání detekce GM1 gangliosidu v jaterní a mozkové tkáni po odlišných fixacích.....	76
4.2. Vliv modulace aktivity HMOX na obsah a složení GSL v jaterní tkáni při cholestáze indukované estrogy.....	78
4.2.1. Stanovení markerů jaterního poškození .....	78
4.2.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra .....	79
4.2.3. Analýza jaterních gangliosidů .....	81
4.2.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz .....	83
4.2.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni .....	84
4.3. Změny ve složení a distribuci glykolipidů u obstrukční cholestázy.....	87
4.3.1. Stanovení markerů jaterního poškození .....	87
4.3.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra .....	88
4.3.3. Analýza jaterních gangliosidů .....	88
4.3.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz .....	90
4.3.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni .....	91
4.4. Vliv modulace HMOX na obstrukční cholestázu.....	92
4.4.1. Vliv modulace HMOX na markery jaterního poškození .....	92
4.4.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra .....	93
4.4.3. Analýza jaterních gangliosidů .....	94
4.4.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz .....	95
4.4.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni .....	96

5. DISKUZE.....	99
6. ZÁVĚR.....	105
7. LITERATURA.....	107
8. PŘÍLOHY.....	121
9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ .....	185
9.1. Publikace týkající se tématu disertační práce.....	185
9.2. Publikace týkající se jiných témat .....	186

## Abstrakt

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium glykosfingolipidů v jaterní tkáni potkana u různých typů cholestatického onemocnění a vlivu oxidačního stresu na změny ve složení a lokalizaci gangliosidů.

Nejprve byly optimalizovány metodické podmínky pro imunochemickou detekci GM1 gangliosidu (zástupce glykosfingolipidové rodiny). Zjistili jsme, že zcela klíčovým faktorem při fixaci histologických řezů je minimalizace obsahu vody ve fixačním činidle. Optimalizovanou metodiku jsme poté využili při *in vivo* experimentech.

Na modelu cholestázy indukované estrogeny jsme prokázali, že působením vysoké koncentrace žlučových kyselin a oxidačního stresu dochází ke změnám v syntéze a distribuci gangliosidů v játrech. Pokud u experimentálních zvířat indukujeme antioxidační enzym hemoxygenázu a snížíme tak oxidační stres, dojde k posunu glykosfingolipidového spektra zpět ke kontrolním hodnotám.

Analogickým experimentem na potkanech s mikročirurgickým podvazem segmentálních jaterních žlučovodů jsme zjistili, že změny v lokalizaci a syntéze gangliosidů nejsou přísně specifické pro určitý typ cholestatického poškození, ale pravděpodobně se jedná o obecnější mechanismus hepatoprotekce. Rovněž jsme potvrdili významnou roli bilirubinu, vznikajícího z hemu účinkem hemoxygenázy, v ochraně hepatocytů před oxidačním poškozením vysokými koncentracemi žlučových kyselin při obstrukční cholestáze.

Výsledky předkládané disertační práce dokazují, že za podmínek retence žlučových kyselin a zvýšeného oxidačního stresu v játrech dochází ke změnám v syntéze a distribuci glykosfingolipidů, které hrají díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem důležitou roli v ochraně hepatocytů. Indukcí HMOX lze docílit snížení oxidačního stresu a ovlivnit tak metabolismus gangliosidů.

**Klíčová slova:** GM1 gangliosid, hemoxygenáza, cholestáza, oxidační stres

## Abstract

This thesis is focused on the study of glycosphingolipids in the rat liver in different types of cholestasis and the effect of oxidative stress on changes in the composition and localization of gangliosides.

First, it was necessary to optimize the immunochemical detection of glycosphingolipids. GM1 ganglioside was selected as a representative of a large glycolipid family. We found that minimum water content in the fixing solution was a key condition for fixation of histological sections. Optimized method of GM1 detection was subsequently used in *in vivo* experiments.

We have demonstrated that estrogen-induced cholestasis characterized by high concentrations of bile acids and increased oxidative stress caused changes in the synthesis and distribution of liver gangliosides. HMOX induction is associated with a reduction in oxidative stress level and accompanied by normalization in GSL content.

In experiments with obstructive cholestasis, we found that changes in the distribution and synthesis of gangliosides were not strictly specific to a particular type of cholestasis. We assume that it represents a general mechanism of hepatoprotection. We also confirmed the important role of bilirubin, product of HMOX reaction, in protection of hepatocytes against oxidative damage caused by high concentrations of bile acids in obstructive cholestasis.

The results of the thesis demonstrate that accumulated bile acids and increased oxidative stress in the liver result in changes in the synthesis and distribution of glycosphingolipids. These molecules play important role in hepatoprotection due to their physical-chemical properties. HMOX induction may reduce oxidative stress and affect metabolism of gangliosides.

**Key words:** GM1 ganglioside, Heme oxygenase, Cholestasis, Oxidative stress

## Seznam zkratek

ABAP... 2,2-azobis(2-amidinopropan)

aBDL... skupina s podvazem segmentálních žlučvodů a aktivovanou hemoxygenázou (bile duct ligation + heme oxygenase activation)

AC... kyselá ceramidáza

ACy... adenylátcykláza

aCDase... kyselá ceramidáza

aE... skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou hemoxygenázou

ALP... alkalická fosfatáza

ALT... alaninaminotransferáza

aSMasa... kyselá sfingomyelináza

AST... aspartátaminotransferáza

BDL... skupina s podvazem segmentálních žlučvodů (bile duct ligation)

BS... soli žlučových kyselin

BSA... hovězí sérový albumin

BSEP... transportér pro soli žlučových kyselin (bile salt export pump)

BLVR... biliverdinreduktáza

C:M... chloroform:methanol

C:M:V... chloroform:metanol:voda

C... kontrolní skupina zvířat

cAMP... cyklický adenosinmonofosfát

cDNA... komplementární deoxyribonukleová kyselina

Cer... ceramid

CerS... (dihydro)ceramidesyntáza

CERT... protein transportující ceramid

CFTR... cysticko-fibrotický transmembránový regulátor

cGMP... cyklický guanosinmonofosfát

cMOAT (MRP2)... kanalikulární multispecifický transportér organických iontů

CO... oxid uhelnatý

CO<sub>2</sub>... oxid uhličitý

Cyt... cytoplasma

DAB... diaminobenzidin tetrahydrochlorid

DES... dihydroceramid-desaturáza

DHCer... dihydroceramid

E... skupina s aplikací ethinylestradiolu

EE... 17 $\alpha$ -ethinylestradiol

ER... endoplasmatické retikulum

FAPP2... transportér pro glukosylceramid

Fe... ionty železa

FW... vlhká váha tkáně

GA2... gangliosid GM2 bez zbytku kyseliny sialové

Gal... galaktóza

GalCer... galaktosylceramid

GalNAc... N-acetylgalaktosmin

GalNAcT... N-acetylgalaktosyltransferáza

GalT... galaktosyltransferáza

Gb... globo série gangliosidů

GCasa... glukosylceramidáza

GC/MS... plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GCS... glukosylceramidsyntáza



GD1a... gangliosid GD1a

GD1b... gangliosid GD1b

GD2... gangliosid GD2

GD3... gangliosid GD3

Gg... ganglio série gangliosidů

GGT...  $\gamma$ -glutamyltransferáza

Glc... glukóza

GlcCer... glukosylceramid

GlcNAc... N-acetylglukosamin

GM1... gangliosid GM1

GM2... gangliosid GM2

GM3... gangliosid GM3

GM4... gangliosid GM4

GSL.... glykosfingolipidy

GT1b... gangliosid GT1b

HgO... oxid rtuťnatý

HMOX.... hemoxygenáza

HPTLC... vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie

HSP... proteiny teplotního šoku (heat shock protein)

ChTB... B podjednotka cholera toxinu

iBDL... skupina s podvazem segmentálních žlučových a inhibovanou hemoxygenázou (bile duct ligation + heme oxygenase inhibition)

iE... skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou hemoxygenázou

iGB...isoglobo série gangliosidů

IUPAC/IUB... Spojená komise pro biochemickou nomenklaturu a čistou chemii

LacCer... laktosylceramid

Lc... lakto série gangliosidů

LPS... lipopolysacharid

L-SMase... lysosomální sfingomyelináza

MAPK... mitogenem aktivovaná proteinkináza

MDR... lékově rezistentní proteiny (multidrug resistance protein)

MnO... oxid manganatý

MRP... proteiny příbuzné lékově rezistentním proteinům (multidrug resistance – associated protein)

NAD... nikotinamidadenindinukleotid

NADP... nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADH... redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

NADPH... redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu

NaOH... hydroxid sodný

NBT... nitro bluetetrazolium

nCDase... neutrální ceramidáza

NeuNAc... kyselina neuraminová

nLc... neolakto série gangliosidů

NO... oxid dusnatý

nSMase... neutrální sfingomyelináza

NTCP... Na<sup>+</sup>-taurocholátový transportér

OA<sup>-</sup>... organické anionty

OATP... polypeptid transportující organické anionty

PBS... fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PD... 1,2-propanediol

RGD... detektor redukujícího plynu

ROS... volné kyslíkové radikály

RT-qPCR... kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

S1P... sfingosin-1-fosfát

SAP.... saposin

SAT.... sialyltransferáza

SD... směrodatná odchylka

Sin/Cyt... poměr denzity GM1 mezi sinusoidální membránou a cytoplasmou

Sin... sinusoidální membrána

SM... sfingomyelin

SMS... sfingomyelinsyntáza

SnMP... mesoporfyrin cínu

SphK... sfingosinkináza

SO... skupina zvířat s laparotomií (sham operated)

SPT... serinpalmitoyltransferáza

S-SMase... sekreční forma sfingomyelinázy

TLC... chromatografie na tenké vrstvě

ZK... žlučové kyseliny

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Struktura, triviální názvy, symboly a zkrácené symboly GSL doporučené dle IUPAC – IUBMB/JCBN .....	21
Tabulka 2: Struktura gangliosidů a jejich zkratky podle Svennerholma .....	23
Tabulka 3: Extrakce GM1 gangliosidu po různých druzích fixace s následným denzitometrickým vyhodnocením .....	73
Tabulka 4: Markery cholestázy u experimentálních zvířat .....	79
Tabulka 5: Změna aktivity HMOX a celkové antioxidační kapacity séra v odpovědi na modulaci HMOX a podávání estrogenů .....	80
Tabulka 6: Relativní exprese sialyltransferázy II a galaktosyltransferázy II po modulaci HMOX a aplikaci estrogenů .....	83
Tabulka 7: Změny v distribuci GM1 gangliosidu v hepatocytech po aplikaci estrogenů a modulaci HMOX.....	84
Tabulka 8: Vliv podvazu žlučových cest na stupeň cholestázy.....	87
Tabulka 9: Vliv podvazu segmentálních žlučovodů na změny v aktivitě HMOX a celkové antioxidační kapacitě séra.....	88
Tabulka 10: Vliv modulace HMOX na stupeň cholestatického jaterního poškození.....	93
Tabulka 11: Vliv modulace HMOX na celkovou antioxidační kapacitu séra.....	93
Tabulka 12: Vliv modulace HMOX na celkový obsah jaterních gangliosidů.....	94
Tabulka 13: Efekt modulace HMOX na expresi mRNA klíčových enzymů, biosyntetické dráhy jaterních gangliosidů.....	96

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktury sfingosinu, ceramidu a gangliosidu .....	18
Obrázek 2: Schéma jednotlivých sérií glykosfingolipidů .....	20
Obrázek 3: TLC gangliosidů a jejich struktura.....	22
Obrázek 4: Biosyntéza, transport a degradace glykosfingolipidů .....	25
Obrázek 5: Biosyntetické větve GSL .....	27
Obrázek 6: Katabolická dráha GSL s vyznačením možných chorob souvisejících s jejich metabolismem.....	29
Obrázek 7: Uspořádání gangliosidů a fosfolipidů ve vodném prostředí .....	30
Obrázek 8: Účinek choleratoxinu v organismu .....	33
Obrázek 9: Hepatobiliární transportní systémy při cholestatických stavech .....	39
Obrázek 10: Detekce glykolipidů pomocí protilátek a choleratoxinu .....	42
Obrázek 11: Analýza [ <sup>3</sup> H]–GSL na tenké vrstvě po různých fixacích .....	43
Obrázek 12: Katabolická dráha hemu.....	48
Obrázek 13: Degradční dráha hemu a vlastnosti jejich biologicky aktivních produktů.....	49
Obrázek 14: Vliv extrakčních činidel na gangliosid GM1 .....	59
Obrázek 15: Schéma imunohistochemické detekce GM1 gangliosidu.....	64
Obrázek 16: Analýza obrazu GM1 gangliosidu se zvýrazněním sinusoidální a subsinusoidální cytoplasmatické oblasti.....	65
Obrázek 17: Degradční dráha hemu a princip stanovení aktivity HMOX.....	68
Obrázek 18: Strukturní vzorec Troloxu.....	69
Obrázek 19: Extrakce gangliosidu GM1 .....	72
Obrázek 20: Fixace kryostatových řezů jaterní tkáně .....	75
Obrázek 21: Porovnání fixačních časů a teplot u acetonové a 4% formaldehydové fixace.....	75

Obrázek 22: Vliv vodné složky na extrakci GM1 gangliosidu do acetonu při detekci choleratoxinem.....	76
Obrázek 23: Srovnání fixačních roztoků při detekci GM1 v jaterní a mozkové tkáni.....	77
Obrázek 24: Efekt modulace HMOX na celkovou antioxidační kapacitu séra cholestatických zvířat.....	80
Obrázek 25: Účinek cholestázy indukované estrogeny a modulace HMOX na obsah celkových gangliosidů v jaterní tkáni.....	81
Obrázek 26: Kvantifikace změn ve složení jaterních gangliosidů při cholestáze vyvolané estrogeny a modulaci HMOX .....	82
Obrázek 27: Účinek modulace HMOX na redistribuci GM1 gangliosidu v hepatocyty .....	85
Obrázek 28: Vliv modulace HMOX na lokalizaci GM1 gangliosidu při cholestáze .....	86
Obrázek 29: Efekt obstrukční cholestázy na celkový obsah gangliosidů v játrech.....	89
Obrázek 30: Účinek obstrukční cholestázy na spektrum jaterních gangliosidů.....	90
Obrázek 31: Efekt obstrukční cholestázy na expresi mRNA klíčových enzymů syntézy jaterních gangliosidů.....	91
Obrázek 32: Lokalizace GM1 v kontrolních a cholestatických jaterních vzorcích.....	91
Obrázek 33: Vliv obstrukční cholestázy na přesun GM1 gangliosidu.....	92
Obrázek 34: Vliv modulace HMOX při obstrukční cholestáze na spektrum jaterních gangliosidů.....	95
Obrázek 35: Lokalizace gangliosidu GM1 v jaterní tkáni.....	97

# 1. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

## 1.1. Úvod

Gangliosidy, patřící do skupiny glykosfingolipidů (GSL), jsou komponenty zakotvené v buněčných membránách eukaryotických buněk, které ve své struktuře obsahují jeden nebo více zbytků kyseliny sialové. Hydrofobní ceramidová složka je v membráně zanořena do vnější části fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco hydrofilní oligosacharidová část je situována do extracelulárního prostoru. Zde zprostředkovává interakce s exogenními ligandy a funguje tak jako jejich receptorová doména (např. GM1 pro cholera toxin či GT1b pro tetanotoxin (Schengrund 2003)). Gangliosidy rovněž fungují jako důležité markery nádorové transformace (Hakomori 1992), mají nezastupitelnou úlohu v mezibuněčné adhezi (Hakomori 1994) a důležitou funkci při zpevňování fluidní fosfolipidové dvojvrstvy (Jirkovská et al. 2007).

Pokles membránové fluidity je popisován například u cholestatického onemocnění jater, které je doprovázeno vyššími sérovými hodnotami žlučových kyselin (ŽK), konjugovaného bilirubinu a zároveň zvýšenou aktivitou alkalické fosfatázy (ALP) a  $\gamma$ -glutamyltransferázy (GGT). Důvodem elevace popsaných analytů je snížení odtoku žluči z jater a retence žlučových komponent v cirkulaci (Boyer 2007). Popsané stavy jsou často vyvolány zánětem způsobeným lipopolysacharidem (LPS) gramnegativních bakterií (Trauner et al. 1999) a poruchou motility žlučovodů s možným ascendentním přechodem infekce do jater. Prevalence cholestatického poškození jater v posledních letech významně stoupá, a to především v důsledku zvýšeného užívání některých léků (např. cyklosporin A, nebo rifampicin), hormonální antikoncepce, vyšší incidence nádorových onemocnění žlučových cest, cholestatických forem virových hepatitid, apod. Cholestáza může bez včasné zahájené léčby přejít v biliární cirhózu a takto postižení nemocní jsou často indikováni k jaterní transplantaci

(Green R. M 1995). Poškození hepatocytů zřejmě souvisí s akumulací hydrofobních žlučových kyselin, které se podílejí na vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS), rozvoji oxidačního stresu a nekrózy jaterních buněk (Sherlock S. 2004). Vlastní cholestatická onemocnění mohou být rozdělena např. dle lokalizace poškození na:

- 1) intrahepatální (poškození je na úrovni hepatocytů či drobných intrahepatálních žlučovodů);
- 2) extrahepatální (poškození je na úrovni segmentálních žlučovodů, ductus hepaticus communis či hlavního žlučovodu).

V experimentech s intrahepatální cholestázou indukovanou estrogeny bylo popsáno zmnožení gangliosidů biosyntetické b- větve: GD3, GD1b a GT1b (Jirkovská et al. 2007; Majer et al. 2007) v játrech cholestatických potkanů. V rámci této studie byl rovněž sledován přesun GM1 gangliosidu do sinusoidální membrány cholestatických hepatocytů s vysvětlením, že se tímto způsobem hepatocyty brání detergentním účinkům vysokých koncentrací akumulovaných žlučových kyselin.

Hemoxygenáza (HMOX, EC 1.14.99.3), klíčový enzym v katabolické dráze hemu, má prokazatelné hepatoprotektivní účinky. Zejména prostřednictvím svých metabolických produktů (oxid uhelnatý, biliverdin a železo) chrání jaterní buňky před zánětlivými a cytotoxickými inzulty a oxidačním stresem, spouštěným např. ROS, těžkými kovy, bakteriálním lipopolysacharidem, peroxidem vodíku, hemem, hemovými deriváty nebo ultrafialovým zářením (Sardana et al. 1981; Keyse et al. 1989; Shibahara S 1993; Takeda et al. 1994; Takahashi et al. 1996; Hara et al. 1999; Maines et al. 2005; Wu 2005; Vitek et al. 2007; Xue et al. 2007).

Oxid uhelnatý (CO) byl dlouhá léta považován za pouhý toxický produkt nedokonalého spalování fosilních paliv. Studium jeho metabolismu v organismu bylo zjištěno, že CO má antiapoptotické, antiproliferativní, protizánětlivé, antiaterogenní a cytoprotektivní účinky (Mottetlini et al. 1998; Ryter et al. 2002; Liu et al. 2003; Vanova et al. 2014; Muchova et al.



2015) a řadí se také mezi důležité signální molekuly. V neposlední řadě byl rovněž popsán jeho pozitivní vliv na produkci a tok žluči (Sano et al. 1997). Výše popsané účinky mohou souhrnně ovlivňovat cholestatická onemocnění jater (Motterlini 2005; Muchova et al. 2011; Vanova et al. 2014; Muchova et al. 2015).

Bilirubin chrání buňky před volnými kyslíkovými radikály (ROS) prostřednictvím redoxního cyklu, který spočívá v redukci biliverdinu na bilirubin se silnými antioxidačními a protizánětlivými účinky a jeho zpětnou oxidaci na biliverdin (Baranano et al. 2002). Bilirubin rovněž funguje jako „odstraňovač“ (scavenger) singletového kyslíku, reaguje se superoxidovými radikály a slouží jako substrát pro peroxidázy v přítomnosti peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů (Stocker et al. 1987; Vitek et al. 2007).

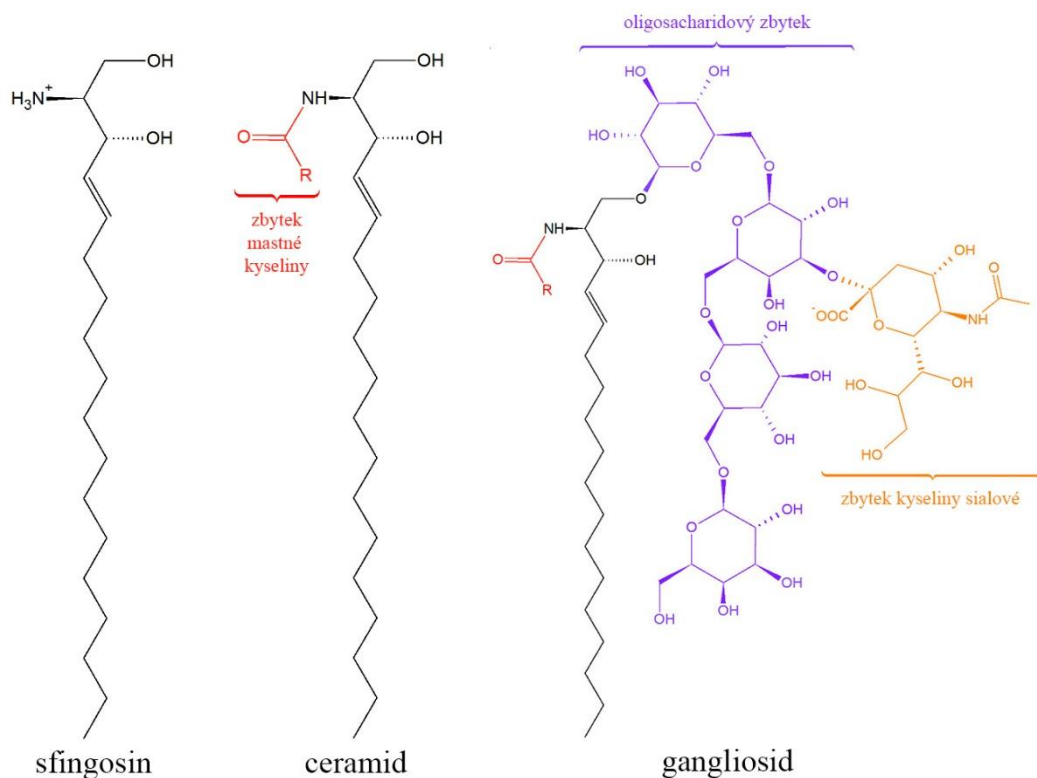
Volné dvojmocné železo působí na organismus silně toxicky, nicméně je v organismu skladováno ve formě ferritinu, který má naopak cytoprotektivní účinky. Zároveň dochází ke zvýšení aktivity ATPázové pumpy, což má za následek eliminaci intracelulárního železa z organismu (Ferris et al. 1999). Na rozdíl od železa působí ferritin protektivně, avšak přímá korelace mezi expresí ferritinu a HMOX prokázána doposud nebyla (Otterbein et al. 1997; Jeney et al. 2002).

Dnes již není pochyb o tom, že estrogeny indukovaná cholestáza je doprovázena kvantitativními i kvalitativními změnami jaterních gangliosidů, nicméně otázkou zůstává, jakou roli zde hraje oxidační stres. Tato problematika nebyla doposud uspokojivě řešena, a proto cílem disertační práce bylo nejprve optimalizovat fixační a detekční podmínky gangliosidů v jaterní tkáni potkana a následně zjistit, zda zvýšení či snížení úrovně oxidačního stresu prostřednictvím modulace aktivity HMOX může ovlivnit syntézu a distribuci gangliosidů v cholestatických játrech.

## 1.2. Glykosfingolipidy

### 1.2.1. Struktura a názvosloví

Glykosfingolipidy jsou především membránové komponenty, které nacházíme u obratlovců, rostlin, hub, některých prokaryotických organismů a virů. Svoji strukturou odpovídají složeným lipidům s amfifilním charakterem. Obsahují lipofilní část zvanou ceramid, která je vázána glykosidovou vazbou k hydrofilní oligosacharidové části. Variabilita lipofilní struktury je způsobena různými sfingoidními basemi či acyly mastných kyselin a je zanořena do vnější vrstvy plasmatické membrány. Ceramid je tvořen sfingosinem a vyšší mastnou kyselinou, která je k němu připojena amidovou vazbou (Obr. 1). Hydrofilní část je složena z různého počtu monosacharidových jednotek a je situována do extracelulárního prostoru (Obr. 1) (Tettamanti et al. 1988; Sonnino et al. 2007).



Obr. 1: Struktury sfingosinu, ceramidu a gangliosidu.

### Dělení glykosfingolipidů dle sacharidové části:

- 1) Neutrální: mono-, oligo-, polyglykosfingolipidy tvořené neutrálními monosacharidovými jednotkami (glukóza, galaktóza, fukóza, N-acetylglukosamin či N-acetylgalaktosamin)
- 2) Kyselé: obsahují monosacharidové jednotky s kyselými skupinami, které jsou připojené na oligosacharidový řetězec
  - a. Sialoglykosfingolipidy- gangliosidy obsahující jeden nebo více zbytků sialových kyselin
  - b. Sulfoglykosfingolipidy- sulfamidy s estericky vázanou sulfo skupinou
  - c. Fosfoglykosfingolipidy- obsahují fosfátovou skupinu

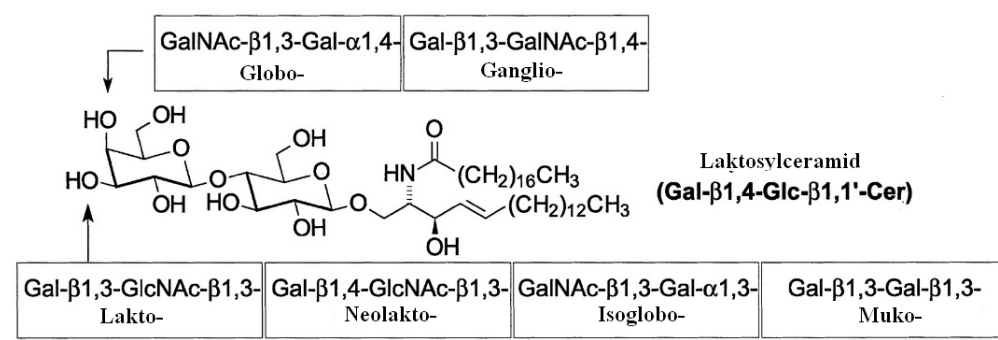
### Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC/IUB

Komise pro názvosloví IUPAC (The Biological Nomenclature Commission of IUPAC, The Commission of Editors of Biochemical Journals of IUB) vytvořila semisystematické názvosloví, které s ohledem na sacharidovou část a vysokou míru variability lipidové části využívá pravidel pro názvosloví oligosacharidů a lipidová část bývá nazývána jako ceramid. Téměř všechny GSL vycházejí z laktosylceramidu a třetí či čtvrtá sacharidová jednotka ukazuje začlenění oligosacharidů do sérií. Jednotlivé série se označují předponou ganglio-, globo-, lakto-, neolakto-, atd. a jsou odlišeny dle struktury a biogenetické příbuznosti (Obr. 2). S ohledem na izolaci a charakterizaci nových glykolipidů je názvosloví stále doplňováno a revidováno. V této práci je vycházeno z doporučení z roku 1997, které vyšlo následující rok (Chester 1998). Počet monosacharidových jednotek v oligosacharidovém řetězci se označuje: diosa, -triosa, -tetraosa, atd. D- a L- konfigurace sacharidů se vynechávají, protože veškeré sacharidy jsou v D- konfiguraci. Výjimku tvoří pouze fukóza a ramnóza, které jsou v konfiguraci L-. Pro popis oligosacharidů se užívají symboly a glykosidické vazby či

anomerní konfigurace se píše do závorek mezi monosacharidovými jednotkami (př.:  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-, zkrácená forma zápisu: Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\alpha$ ), ještě kratší forma: Gal $\alpha$ -3Gal $\alpha$ . Z důvodu neměnné pozice anomerního uhlíku při krátké formě připojovaného monosacharidu pro každý monosacharid lze zápis ještě zkrátit na Gal $\alpha$ 3Gal $\alpha$ .

Používání zkrácených názvů, označení polohy substituentů a místa větvení na oligosacharidovém řetězci glykosfingolipidů se řídí opět pravidly IUPAC-IUBMB/JCBN (Tab. 1).

- Zkratka série + počet monosacharidů + osylceramid (např. gangliotriaosylceramid,...)
- Římská číslice označuje pozici monosacharidu počítaného od ceramidu, ke kterému je substituent připojen
- Arabská číslice v horním indexu vypovídá o poloze uhlíkového atomu v monosacharidové jednotce, ke kterému je připojen substituent (např. IV<sup>2</sup>- $\alpha$ -fukosyl-IV<sup>3</sup>- $\alpha$ -galaktosylneolaktotetraosylceramid). Připojení dvou sialylových skupin za sebou se zapisuje pomocí dolního indexu (Neu5Ac<sub>2</sub>).



Obr. 2: Schéma jednotlivých sérií glykosfingolipidů. Upraveno dle (Kolter et al. 2002).

Struktura	Triviální název	Symbol (zkr. symbol)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotriaosylceramid	GbOsa <sub>3</sub> Cer (Gb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotetraosylceramid	GbOsa <sub>4</sub> Cer (Gb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotriaosylceramid	iGbOsa <sub>3</sub> Cer (iGb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotetraosylceramid	iGbOsa <sub>4</sub> Cer (iGb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotriaosylceramid	McOsa <sub>3</sub> Cer (Mc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotetraosylceramid	McOsa <sub>4</sub> Cer (Mc <sub>4</sub> Cer)
GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotriaosylceramid	LcOsa <sub>3</sub> Cer (Lc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotetraosylceramid	LcOsa <sub>4</sub> Cer (Lc <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	neolaktotetraosylceramid	nLcOsa <sub>4</sub> Cer (nLc <sub>4</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotriaosylceramid	GgOsa <sub>3</sub> Cer (Gg <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotetraosylceramid	GgOsa <sub>4</sub> Cer (Gg <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galabiosylceramid	GaOsa <sub>2</sub> Cer (Ga <sub>2</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galatriaosylceramid	GaOsa <sub>3</sub> Cer (Ga <sub>3</sub> Cer)

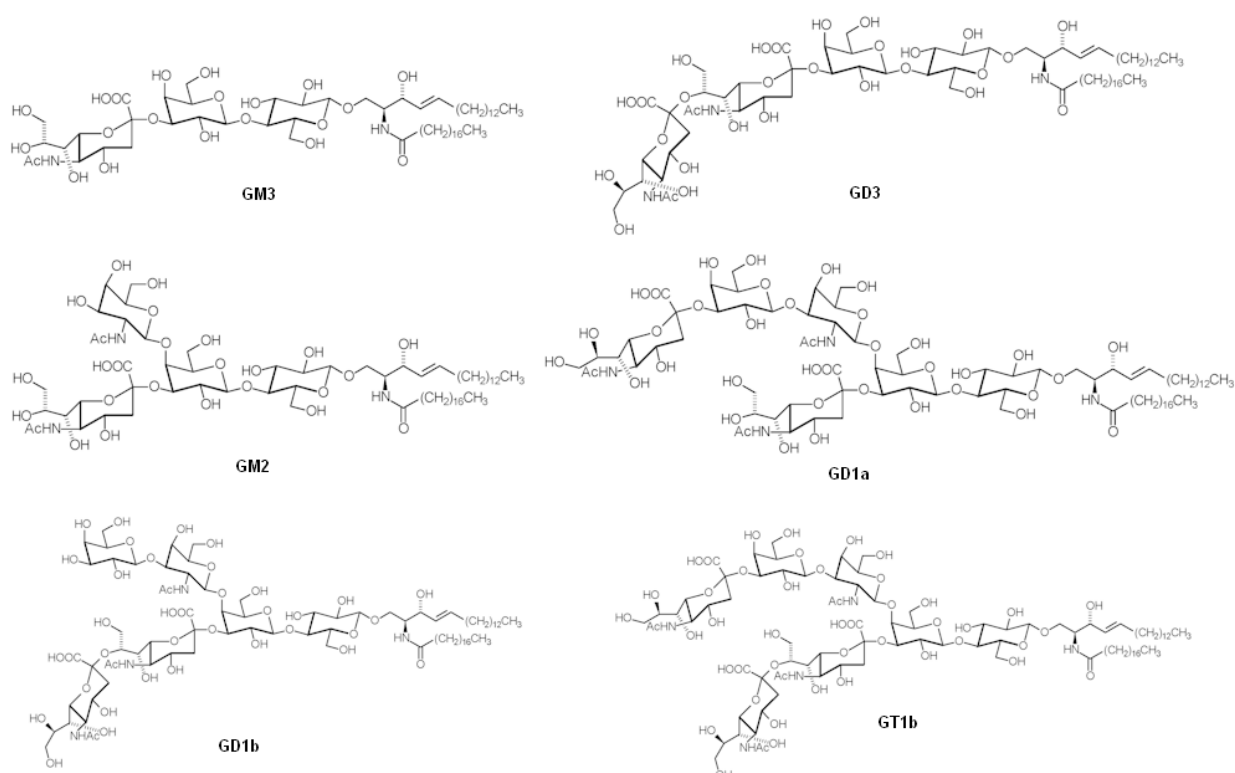
Tab. 1: Struktura, triviální názvy, symboly a zkrácené symboly GSL doporučené dle IUPAC - IUBMB/JCBN. Ganglio- Gg, Lakto- Lc, Neolakto- nLc, Globo- Gb, Isoglobo- iGb.

Pro svou jednoduchost se po celém světě rozšířilo nesystematické značení gangliosidů podle Svennerholma (Svennerholm 1963; Svennerholm 1994). Gangliosidy jsou označeny písmenem G, další písmenko rozčleňuje gangliosidy dle počtu skupin kyseliny sialové v molekule na M mono-, D di-, T tri-, Q tetra- a P pentasialogangliosidy. Následné členění gangliosidů využívá jejich vlastností při separaci na tenké vrstvě (TLC) a nevychází již z popisu chemické struktury. Čísla 1, 2, 3 a 4 odkazují na pořadí zón monosialogangliosidů počítaných od startu chromatogramu a jednotlivé zóny odpovídají obrácenému poměru k počtu monosacharidových jednotek v základním oligosacharidovém řetězci (Obr. 3A). Příklad strukturního uspořádání některých gangliosidů je na Obr. 3B. Označení a–, b– či c– slouží pro odlišení polohových izomerů (Tab. 2).

**A.**



**B.**



Obr. 3: A) Dělení gangliosidů na TLC. Polárnější gangliosidy, tj. gangliosidy s velkým počtem sacharidových jednotek, mají od startu menší vzdálenost. B) Strukturní uspořádání jednotlivých gangliosidů. Upraveno dle (Farwanah, 2012).

<b>Struktura gangliosidů</b>	<b>Zkratka dle Svennerholma</b>
Neu5AcGalCer	<b>GM4</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM3</b>
GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM2</b>
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM1a</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM1b</b>
Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GD3</b>
GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GD2</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GD1a</b>
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GD1b</b>
Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GT1a</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GT1b</b>
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GT1c</b>
Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GQ1b</b>

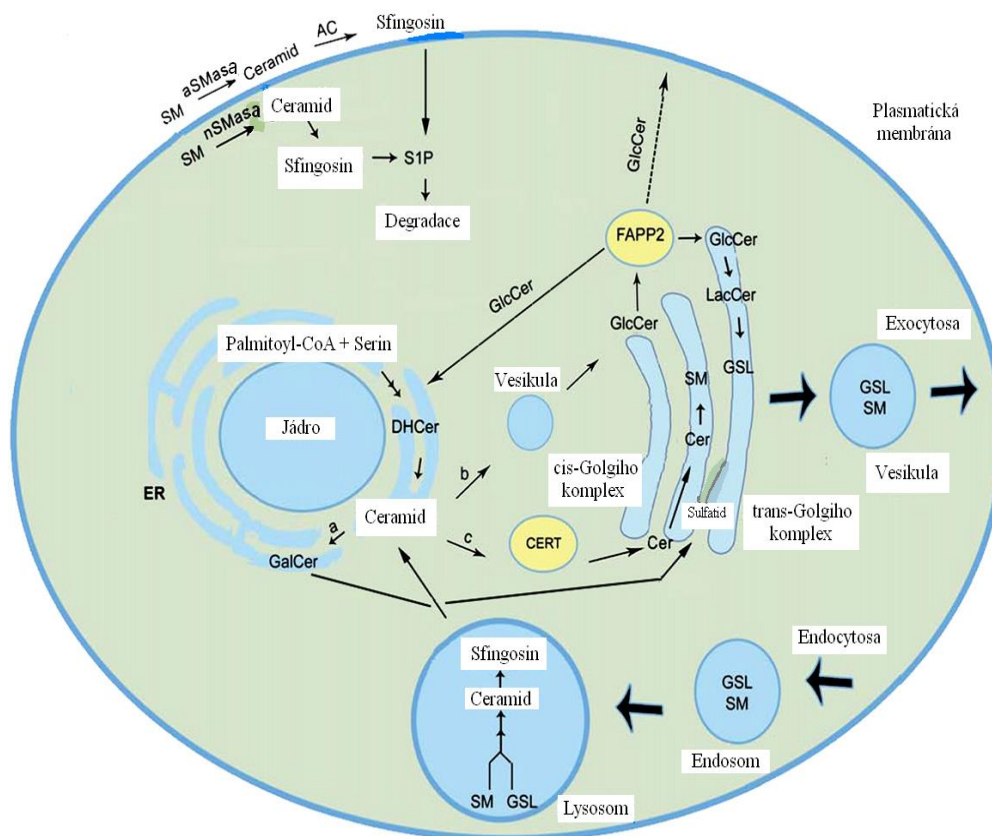
Tab. 2: Struktura gangliosidů a jejich zkratky podle Svennerholma (Svennerholm 1994).

### 1.2.2. Biosyntéza a katabolismus

Klíčovou molekulou biosyntézy GSL je ceramid. Počátečním krokem syntézy ceramidu je kondenzace serinu a palmitoyl-CoA na cytosolové straně endoplasmatického retikula (ER). Tato iniciační reakce je katalyzována pyridoxalfosfát dependentní serinpalmitoyltransferasou (SPT, EC 2.3.1.50) za vzniku 3-ketosfinganinu. Keton je dále redukován NADPH-dependentní ketosfinganinreduktázou (EC 1.1.1.102) na sfinganin a z něj vzniká reakcí s acyl-CoA (katalyzováno dihydroceramidsyntázou, EC 2.3.1.24) dihydroceramid (DHCer). Dihydroceramiddesaturáza (EC 3.4.24.81) odštěpí dva vodíkové atomy za vzniku cis dvojné vazby, a tím vzniká samotný ceramid. Jak dlouhé budou jeho mastné kyseliny, rozhodují buněčně a tkáňově specifické ceramidsyntázy (Gault et al. 2010). Ceramid se může tvořit v lysosomech degradační cestou ze sfingomyelinu (EC 3.1.4.12) nebo na plasmatické

membráně prostřednictvím metabolické cesty zahrnující kyselou (aSMasa, EC 3.1.4.12) a neutrální sfingomyelinázu (nSMasa, EC 3.1.4.12), (Jenkins RW 2009). Ceramid následně podléhá různým metabolickým pochodům (Hanada et al. 2003): **a)** v lumen ER dochází k přeměně na galaktosylceramid (GalCer) a později v Golgiho aparátu na sulfatid (3-sulfo-GalCer) (Burkart et al. 1977); **b)** pomocí vesikul je ceramid přenesen na cytosolovou stranu cis-Golgiho aparátu, kde dochází k přípravě vzniku glukosylceramidu (GlcCer) a **c)** ceramid je transportován do Golgiho aparátu pomocí transportního proteinu (CERT), kde je přeměněn na sfingomyelin (Fukasawa et al. 1999). Také po vzniku GlcCer může docházet k několika možným dějům (van Meer et al. 2003; D'Angelo et al. 2007): **a)** za účasti adaptorového proteinu FAPP2 s funkcí flipázy je GlcCer transportován do endoplasmatického retikula či trans-Golgiho aparátu, kde dochází k přeměně na laktosylceramid (LacCer), kmenový prekurzor pro většinu GSL (Lannert et al. 1994; D'Angelo et al. 2007; Halter et al. 2007; Neumann et al. 2008; Yamaji et al. 2008). Připojení zbytků kyseliny sialové a dalších monosacharidů (prostřednictvím membránově vázaných glykosyltransferáz) na LacCer je počátkem biosyntézy gangliosidů (Kolter et al. 2002); **b)** dochází k transportu na plasmatickou membránu doposud ne zcela známým mechanismem; **c)** pomocí exocytosy dochází k přenosu do extracelulární matrix. GSL vznikající v buňce ji mohou opustit exocytosou a extracelulární GSL mohou být transportovány opačným směrem endocytosou s následnou degradací lysosomálními hydrolázami na sfingosin a mastné kyseliny (Kolter et al. 2005; Jenkins RW 2009). Výše popsané cesty GSL jsou naznačeny v Obr. 4.





Obr. 4: Biosyntéza, transport a degradace glykosfingolipidů. Ceramid, prekurzor syntézy GSL, může vznikat několika cestami: *de novo*, degradací sfingomyelinu či prostřednictvím sfingomyelináz. Ceramid se následně může měnit na GalCer, GlcCer či sfingomyelin. Schéma také zachycuje jednotlivé vesikulární pochody a možné lysosomální štěpení GSL na sfingosin a mastné kyseliny (Hanada et al. 2003). Upraveno dle (Xu et al. 2010).

SM– sfingomyelin, aSMase– kyselá sfingomyelináza, nSMase– neutrální sfingomyelináza, AC– kyselá ceramidáza, S1P– sfingosin-1-fosfát, ER– endoplasmatické retikulum, GalCer– galaktosylceramid, DHCer– dihydroceramid, GlcCer– glukosylceramid, CERT– transportní protein pro ceramid, FAPP2– transportní protein pro glukosylceramid, GSL– glykosfingolipidy, LacCer– laktosylceramid

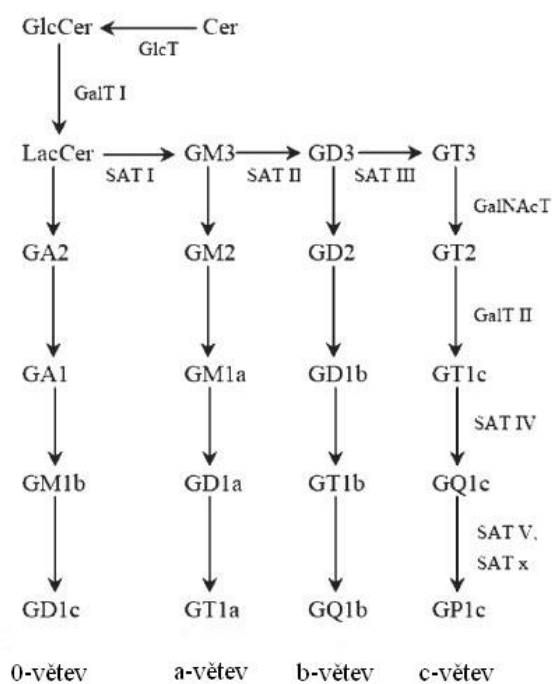
### Biosyntéza gangliosidů z gangliosérie

Výchozí sloučeninou pro biosyntézu gangliosidů je LacCer, který vzniká reakcí glukosylceramidu s UDP-galaktózou za současné katalýzy galaktosyltransferázy I (EC 2.4.1.22). LacCer dále podstupuje reakce katalyzované více (sialyltransferáza– SAT I a II (EC 2.4.99.9, 2.4.99.8) či méně (N-acylgalaktosamintransferáza– GalNAcT, galaktosyltransferáza– GalT, sialyltransferáza III, IV a V (EC 2.4.1.92, 2.4.1.62, 2.4.99. -, 2.4.99.4, 2.4.99. -) specifickými enzymy. SAT I-III transportují zbytek kyseliny sialové na LacCer (SAT-I), gangliosid GM3 (SAT-II) a GD3 (SAT-III) (Carey et al. 1981). Enzymy jsou lokalizovány v lumen Golgiho aparátu (Schwarzmann et al. 1990), vlastní sialylace probíhá v cis části a následná glykosylace v trans části Golgiho komplexu. GM3, GD3 a GT3 gangliosidy jsou počátečními místy biosyntézy tří základních větví GSL, a–, b– a c– větve (Iber et al. 1992). a– a b– větve jsou pozorovány u teplokrevných živočichů, jako jsou savci či ptáci, c– větev se vyskytuje převážně u ryb. Další osud LacCer může být určen připojením N-acetylgalaktosaminu pomocí N-acylgalaktosamintransferázy za vzniku GA2 (= asialo GM2), což je základem pro 0– větev nacházenou u žabí populace, Obr. 5.

Jelikož některé kroky biosyntézy gangliosidů vznikají v cis a jiné v trans Golgiho aparátu, využívají vznikající GSL pro svůj transport vesikulární cestu. Stejně transportní dráhy je využíváno také při přenosu již hotového glykolipidu do plasmatické membrány (Tettamanti et al. 1993; Sandhoff et al. 1994; Xu et al. 2010).

Z hlediska lokalizace biosyntézy jsou GSL z gangliosérie tvořeny především v mozkové tkáni a GSL z lakto- či neolaktosérie ve žláзовých epiteliálních buňkách a pravděpodobně také buňkách endotelu. Právě tyto GSL, konkrétně jejich oligosacharidová část, určují antigenní specifitu krevních skupin (ABH, Lewis, I a i). Biosyntéza lako- a neolaktosérie je zajímavá i tím, že se odlišuje v normálních epiteliálních buňkách od buněk nádorových a fetálních. Zatímco u normálních buněk vznikají rozvětvené polylaktosaminové struktury, u nádorových

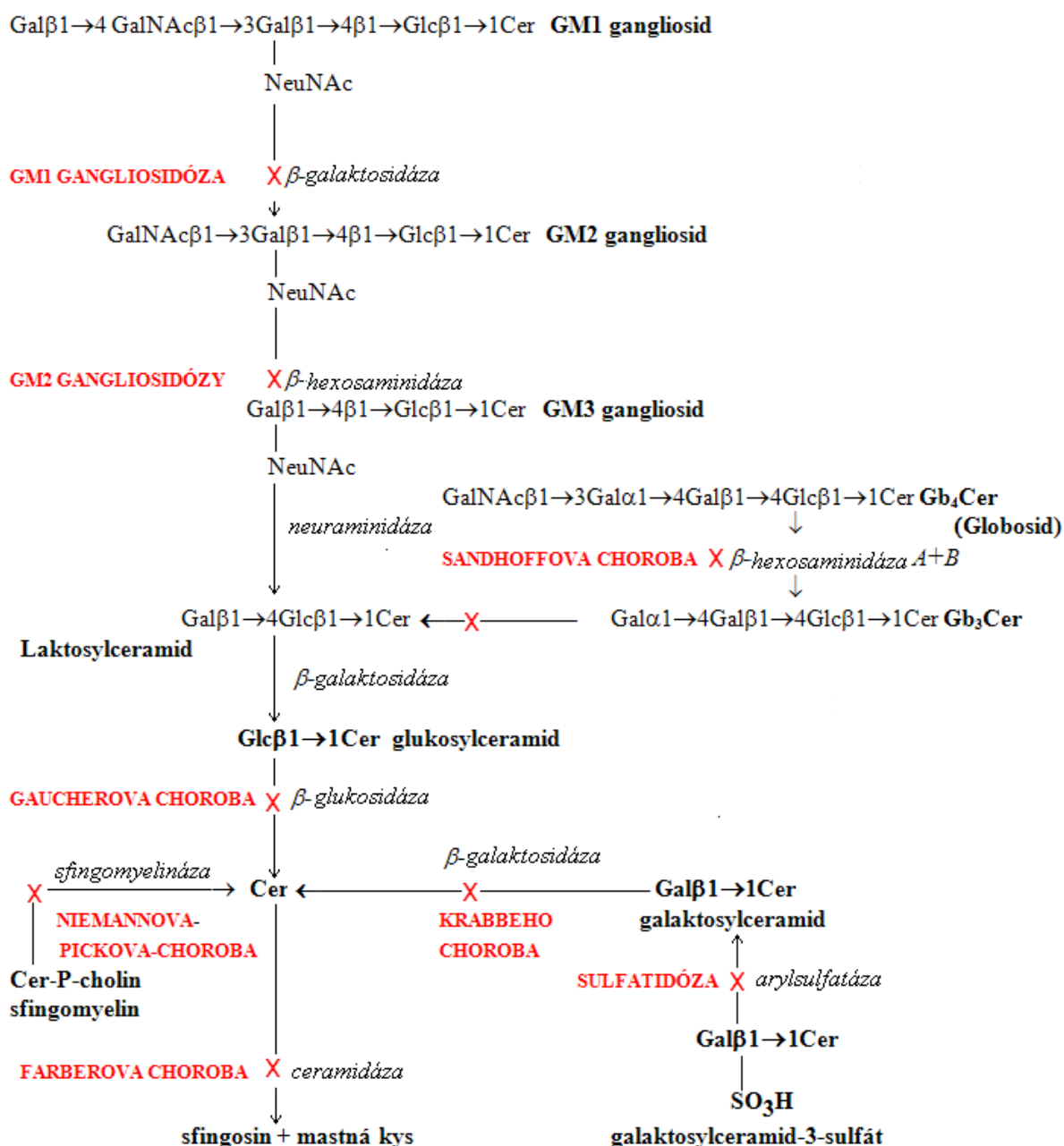
a fetálních buněk dochází k prodlužování oligosacharidového řetězce laktosaminů vlivem zvýšené aktivity  $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc transferázy (EC 2.4.1.147) a potlačení aktivity  $\beta 1 \rightarrow 6$ GlcNAc transferázy (EC 2.4.1.148). Takové struktury jsou  $2 \rightarrow 3$  nebo  $2 \rightarrow 6$  sialylovány, nebo  $2 \rightarrow 3$  fukosylovány za vzniku různých antigenů spojených s nádorovým procesem. Popsána byla rovněž skutečnost, že se terminální glykosylace mění s vývojem, diferenciací a onkogenní transformací (Hakomori 1984).



Obr. 5: Biosyntetické větve GSL. Přísně specifické enzymy SAT-I, SAT-II a SAT-III připojují kyselinu sialovou na LacCer, GM3 a GD3 gangliosidy. Výsledkem jsou gangliosidy GM3, GD3 a GT3 (Schwarzmann et al. 1990), které jsou základem pro jednotlivé větve (Pohlentz et al. 1988; Iber et al. 1992).

Degradace glykosfingolipidů probíhá v lysosomech prostřednictvím kyselých exohydroláz. Nejprve je degradována oligosacharidová složka a následně je ceramid ceramidázou (EC 3.5.1.23) rozštěpen na sfingosin a mastné kyseliny. Katabolická dráha běžných GSL spadajících do globo- a gangliosérie je společně s vyznačením klíčových enzymů a

metabolických blokády u dědičných metabolických chorob uvedena na Obr. 6. Komponenty a fragmenty plasmatické membrány jsou transportovány do nitra lysosomů zejména endocytosou. Následuje recyklace a syntéza chybějících membránových komponent tak, aby nedošlo k porušení dynamické integrity na povrchu buňky. Membránově vázané GSL jsou transportovány pomocí časných endosomů: 1) zpět do plasmatické membrány, avšak na jiné místo= retroendocytosa, 2) do Golgiho aparátu k „přemodelování“ molekuly GSL a 3) do pozdních endosomů a následně do lysosomů k degradaci a produkty jsou využity opětovně jako stavební kameny biosyntézy GSL (Pagano 1990). Pro degradaci je také důležitá délka oligosacharidového řetězce, protože jestliže řetězec obsahuje více než 4 monosacharidové jednotky, je pro degradaci *in vivo* dostačující přítomnost exohydroláz. Pro odbourávání kratších oligosacharidů jsou nutné navíc malé glykoproteinové kofaktory, sfingolipidní aktivátorové proteiny, saponiny (SAP). Existuje pět známých saponinů kódovaných dvěma geny. Jeden gen nese genetickou informaci pro GM2 aktivátor a druhý pro SAP pro-aktivátor (ProSAP), který je následně proteolyticky štěpen na čtyři aktivátory SAP (A– D) (O'Brien et al. 1991).



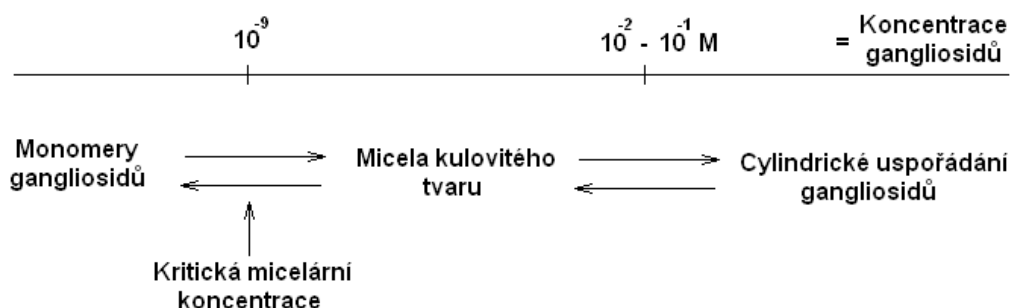
Obr. 6: Katabolická dráha GSL s vyznačením možných chorob souvisejících s jejich metabolismem. Křížkem jsou vyznačena místa poruchy odbourávání GSL, kurzívou deficitní enzymy a červeně příslušná střeďavá onemocnění. Například onemocnění GM1 gangliosidóza vzniká při deficitu enzymu  $\beta$ -galaktosidázy (EC 3.2.1.23).

### 1.2.3. Vlastnosti

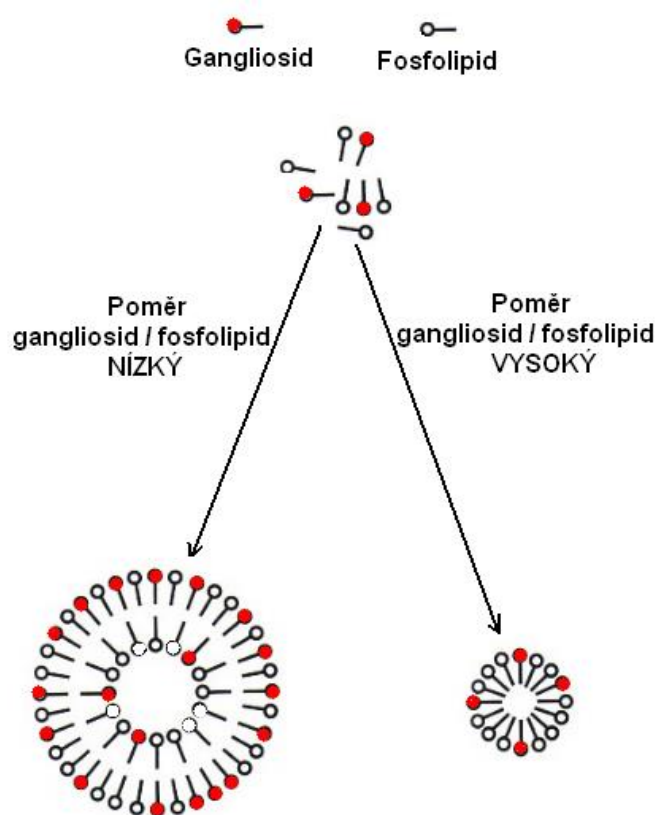
#### Amfifilní vlastnosti

Glykosfingolipidy mají z podstaty své struktury amfifilní vlastnosti, které je dáno přítomností hydrofilní a hydrofobní složky. Na rozdíl od fosfolipidů nevytvářejí dvojvrstevné uspořádání, ale skládají se do micelárních struktur již při velice nízkých koncentracích. Takové struktury, které se skládají z gangliosidů, vznikají již při koncentraci  $10^{-9} - 10^{-2}$  M a v rozmezí  $10^{-2} - 10^{-1}$  M tvoří hexagonálně uspořádané cylindrické útvary, Obr. 7A. Výše popsaná vlastnost je využívána zejména při dialýze nebo gelové filtraci, tj. technikách přečištění GSL od kontaminujících nízkomolekulárních látek. Pokud začne v micelárním uspořádání převažovat koncentrace fosfolipidů nad gangliosidy, dochází k přeskupení do dvojvrstevného uspořádání, následované vytvořením liposomální struktury a GSL přecházejí do vnější fosfolipidové dvojvrstvy, Obr. 7B.

A.



B.



Obr. 7: Uspořádání gangliosidů a fosfolipidů ve vodném prostředí. A) Vysoké koncentrace gangliosidů vytvářejí ve vodném prostředí makromolekulární micely, zatímco při koncentraci  $10^{-2} - 10^{-1}$  M dávají vzniknout cylindrickým útvarům. B) Při vyšší koncentraci gangliosidů nad fosfolipidy vznikají liposomy. Hydrofobní ceramidové části jsou zanořeny směrem do středu a hydrofilní oligosacharidové složky směřují vně micel či cylindrických struktur. Upraveno dle (Tettamanti et al. 1988).

#### Vliv na rigiditu membrány

GSL přispívají k větší pevnosti membrány z důvodů přítomných nasycených mastných kyselin v molekule, vyššího bodu tání ve srovnání s fosfolipidy a v neposlední řadě také tvorbou interakcí s okolními molekulami (Kuikka et al. 2001). Na zpevnění membrány má

vliv jak ceramidová, tak oligosacharidová složka GSL. Ceramidová část zaujímá konformaci, která vychází z rigidity planární amidové vazby mezi sfingoidní bazí a acylem mastné kyseliny a oba uhlíkaté řetězce jsou ve vzájemné paralelní poloze (Pascher 1976; Harris et al. 1978; Sonnino et al. 2007). K tomuto jevu přispívá rovněž trans dvojná vazba mezi C4 a C5 ve sfingosinu a solvatační účinek v C4-C5-C6 sfingoidu. Tato část obsahuje jak akceptor, tak i donor vodíku, a tudíž může docházet k formování stabilních vodíkových vazeb (např. mezi hydroxylovou a karbamidovou skupinou). Příspěvek oligosacharidové části zahrnuje vliv intramolekulových vodíkových vazeb a přítomnost stabilizujících sialových skupin (Bertoli et al. 1981; Tettamanti et al. 1988). Mezimolekulové vodíkové vazby doprovázejí interakci se sousedními molekulami za častého využívání vápenatých iontů.

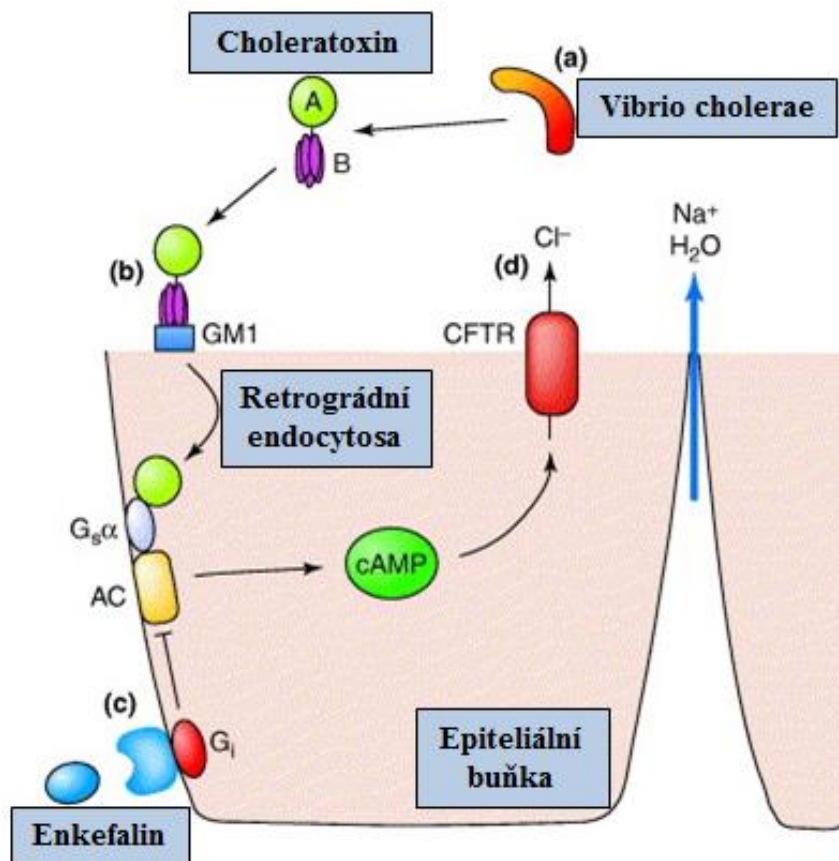
### Mezibuněčné interakce

Je popsáno, že glykosfingolipidy fungují na buňkách jako receptory pro některé bakterie či toxiny (Schengrund 2003). Těchto významných vlastností může být využito např. při cílené detekci gangliosidu GM1 (zástupce gangliosidové rodiny) choleratoxinem.

Choleratoxin se skládá se dvou podjednotek A a B, kde A podjednotka má molekulovou hmotnost cca 28000 g/mol a je složena ze dvou disulfidicky vázaných částí označovaných jako A1 a A2 fragment. Prvně zmíněný fragment s enzymatickou i toxickou aktivitou prostupuje do cytosolu enterocytů a způsobuje sekreci chloridů, což je spojeno s výraznými průjemovými stavy. Dochází k zablokování adenylátcyklázy v aktivním stavu, a tím pádem k akumulaci cAMP a následně k vyplavování chloridových iontů z enterocytů. Výsledkem jsou průjemovitá onemocnění spojená s dehydratací, Obr. 8. Nejdůležitějším úkolem A2 fragmentu je připojení A podjednotky jako celku k pentamerní netoxické B podjednotce, kde každá z pěti proteinových částí má molekulovou hmotnost cca 11600 g/mol. Ve své podstatě se jedná o pětičlenný kruhový lektin, který je schopen vázat pět oligosacharidových částí



GM1 gangliosidů, sloužících jako receptory. Vazba choleratoxinu ke GM1 je považována za velice pevnou, rychlou a poměrně specifickou.



Obr. 8: Účinek choleratoxinu v organismu. Choleratoxin produkován bakterií *Vibrio cholerae* je složen z A a B podjednotky. B podjednotka obsahuje 5 identických peptidových domén ve tvaru prstence a asociuje se s pěti molekulami gangliosidu GM1 na střevních enterocytech. Enzymatická a toxická A podjednotka vstupuje do cytosolu retrográdní endocytosou a dochází k připojení ADP-ribosy (z hydrolyzovaného NAD) na  $\alpha$  podjednotku G proteinu adenylátcyklázy (ACy), která se nachází na vnitřní straně membrány epiteliální buňky. Aktivovaná adenylatcykláza produkuje intracelulární cAMP, což způsobuje sekreci chloridových iontů (přes cysticko-fibrotický transmembránový regulátor, CFTR) na apikální straně plasmatické membrány enterocyту. Léčba průjmových stavů při choleře může být

založena na bázi: **a)** eliminace bakterie prostřednictvím imunitního systému a/nebo antibiotik; **b)** inhibice interakce mezi choleratoxinem a GM1; **c)** inhibice cAMP účinkem např. enkefalinu vázajícího se na opioidní receptor; **d)** inhibice sekrece  $\text{Cl}^-$  iontů prostřednictvím regulace CFTR. Upraveno dle (Thiagarajah et al. 2005).

### 1.3. Cholestáza

Cholestáza je definována jako defekt tvorby nebo odtoku žluče z jater do duodena s lokalizací kdekoliv mezi sinusoidální membránou a Vaterskou papilou (Trauner et al. 1999). Snížený odtok žluče je spojen s akumulací žlučových složek v krvi, jako jsou žlučové kyseliny či bilirubin. V séru můžeme prokázat zvýšené koncentrace žlučových kyselin, konjugovaného bilirubinu a vyšší aktivity alkalické fosfatázy a  $\gamma$ -glutamyltransferázy (ALP a GGT), (Boyer 2007). Cholestatický stav se může vyskytnout buď samostatně nebo v návaznosti na jiná jaterní onemocnění (Trauner et al. 1999). Poškození hepatocytů při cholestáze je způsobeno zejména vlivem hydrofobních žlučových kyselin, které vyvolávají produkci volných kyslíkových radikálů (ROS), rozvoj oxidačního stresu spouští signální kaskády vedoucí až k nekróze buněk (Sherlock S. 2004). Obecně lze tento typ onemocnění rozdělit na chronické a akutní, nebo je lze specifikovat dle místa postižení na intra- a extrahepatální.

***Intrahepatální cholestáza (IHC)*** je způsobena překážkou na úrovni hepatocytu (např. defektem membránových transportérů) nebo drobných intrahepatálních žlučovodů. Příčiny jsou značně různorodé a řadí se sem například účinky některých léků (cyklosporin A, chlorpromazin), hormonů (např. estrogeny) nebo souvisejí s jinými chorobami, jako jsou primární biliární cholangitida, primární sklerozující cholangitida, alkoholová hepatitida atd.

### Cholestáza indukovaná estrogeny

Estrogeny mohou u geneticky predisponovaných žen zapříčinit vznik intrahepatální cholestázy těhotných, cholestázy po terapii perorálními kontraceptivy či substituční léčbě hormony po menopauze (Schreiber et al. 1983). Studie zabývající se rolí estrogenů u jaterních onemocnění dokázaly schopnost modulace proliferačních a sekrečních vlastností epiteliálních buněk, které vystylají žlučovody (Alvaro et al. 2006). Rovněž byla pozorována snížená fluidita sinusoidální membrány a aktivita  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPázové pumpy, což bývá často doprovodným jevem intrahepatální cholestázy těhotných či cholestázy žen užívajících hormonální antikoncepci (Vore 1987; Reyes et al. 1993). Přirozeně se vyskytující estrogeny mohou způsobit cholestázu zejména jako konjugáty s kyselinou glukuronovou (např. estradiol-17 $\beta$ -glukuronid) (Meyers et al. 1980). Mechanismus účinku estrogenů na rozvoj cholestázy není zcela objasněn, ale pravděpodobně k němu dochází zejména u žen s určitou preexistující genovou mutací vedoucí k poruše funkce některých membránových transportérů. K popsaným změnám dochází buď na sinusoidální nebo kanalikulární membráně jaterní buňky. Na sinusoidální membráně se změny týkají hlavně přenašečů **NTCP** ( $\text{Na}^+$ -taurocholate co-transporting polypeptide) a **OATP1B1** z rodiny OATP (organic anion transporting polypeptides). Na kanalikulární membráně jsou modifikovány zvláště transportéry **BSEP** (bile salt export pump) a **MRP2** (multidrug resistance – associated protein). Konkrétní funkce jednotlivých membránových transportních proteinů jsou popsány dále v textu, Obr. 9.

Vliv estrogenů na rozvoj cholestázy dokládá i skutečnost, že se cholestatické příznaky objevují nejčastěji ve 3. trimestru těhotenství, při vícečetném těhotenství nebo při podávání progesteronu. Ženy s tímto typem cholestázy mají během těhotenství několikanásobně vyšší riziko poškození plodu. Akumulované ŽK v krvi matky mohou pronikat placentou a mají arytmogenní efekt s rizikem srdeční zástavy plodu. Zároveň se zvyšuje střevní motilita plodu

s možností odchodu mekonia do plodové vody. Aspirace zkalené plodové vody může mít následně pro plod fatální důsledky.

Laboratorní hodnoty aktivit transamináz jsou až 20 násobně a koncentrace žlučových kyselin až 100 násobně vyšší oproti referenčním hodnotám. Pozorována je také vyšší aktivita ALP a GGT. Těhotenství často provází pruritus různého stupně, který se objeví mezi 25. a 32. týdnem těhotenství. Po porodu, který je nutné často předčasně indukovat (cca 60%), dochází většinou k normalizaci všech klinických příznaků i laboratorních parametrů cholestázy (Vítek 2009). Z histologického hlediska jsou pozorovány izolované infiltrace portálních polí či destrukce žlučovodů. Možný je také imunohistologický průkaz absence klíčových transportních proteinů (např. BSEP či MRP2). Při estrogenovém cholestatickém poškození je mikroskopicky pozorována hepatocelulární nebo kanalikulární cholestáza v zóně 3 jaterního acinu, poškození duktulů a minimální známky zánětu.

### **Transportní proteiny v jaterní tkáni**

Všobecně je známo, že se lipofilní látky přenášejí přes membrány většinou prostou nebo facilitovanou difúzí. Naproti tomu polární látky využívají transportního systému na sinusoidální i kanalikulární membráně. Obecně lze transportní proteiny rozdělit do dvou velkých skupin. **SLC transportéry** (solute carrier), které se vyskytují na sinusoidální membráně a zajišťují přenos látek z krevního oběhu do cytosolu a **ABC transportní proteiny** (ATP-binding cassette), které jsou lokalizovány na sinusoidální (přenášejí látky z cytosolu do krve) i kanalikulární (přenášejí látky z cytosolu do žluče) membráně hepatocytu (Funk 2008).

### **Transportní proteiny na sinusoidální membráně hepatocytu**

**NTCP** (Na<sup>+</sup>- taurocholate co-transporting polypeptide)

- Přenáší taurinové či glycinové konjugáty ŽK, anionty ŽK, bilirubin a další organické anionty z krve do jaterní buňky. Nezbytnou součástí transportního procesu je přenos taurocholátu a sodných iontů (Chandra et al. 2004).

#### **OATP** (organic anion transporting polypeptides)

- Široká skupina transportérů, která se podílí na vychytávání ŽK z krevního řečiště a účastní se přenosu širokého spektra farmak (např. atorvastatin, pravastatin, rifampicin). Tyto transportní proteiny dovolují obousměrný přenos látek přes sinusoidální membránu v důsledku antiportu glutationu, bikarbonátu (transportovány z hepatocytu do krve) proti organickým látkám (přenášeny z krevního řečiště do jaterní buňky) (Funk 2008).

#### **OAT** (organic anion transporters)

- Obousměrné transportní proteiny pro organické anionty (např. pro prostaglandiny), (Sekine et al. 2006).

#### **OCT** (organic cation transporters)

- Obousměrné přenašeče pro organické kationty (např. pro acetylcholin), (Chandra et al. 2004).

#### **MRP** (multidrug resistance-associated protein)

- Skupina transportních přenašečů pro látky směřující z jaterních buněk do krevního řečiště. Popsáno je celkem 9 členů a nejdůležitějším přenašečem této rodiny je pravděpodobně MRP3, který transportuje konjugovaný bilirubin a jiné organické anionty. Při cholestáze je na sinusoidální membráně pozorována zvýšená exprese tohoto transportéru (Chandra et al. 2004).

#### **OST $\alpha/\beta$** (organic solute transporter $\alpha/\beta$ )

- Transportéry, které se podílejí na exkreci žlučových kyselin a organických aniontů do krevního řečiště. Kromě výskytu v hepatocytech je také nalézán v terminální části ilea, kde se podílí na enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin (Dawson et al. 2009).

Transportní proteiny na kanalikulární membráně hepatocytu– transportují látky proti koncentračnímu gradientu do žluče

#### **BSEP** (bile salt export pump)

- Transportér pro konjugované i nekonjugované žlučové kyseliny z jaterní buňky do žluče. Snížená exprese tohoto transportéru je nalézána např. při progresivní familiární intrahepatální cholestáze 2. typu (PFIC2) (Funk 2008).

#### **MRP2** (multidrug resistance – associated protein, cMOAT)

- Přenáší konjugáty glutathionu, kyseliny glukuronové, bilirubin glukuronid či estradiol-17 $\beta$ -glukuronid (Chandra et al. 2004; Alrefai et al. 2007; Funk 2008). Defekt tohoto transportního proteinu je spojován s Dubinovým-Johnsonovým syndromem, který je diagnosticky provázen konjugovanou hyperbilirubinémií.

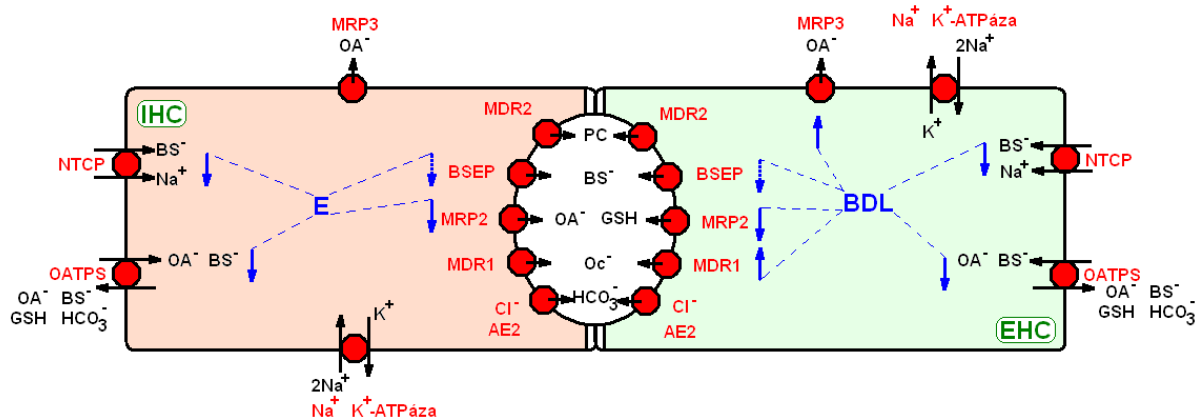
#### **MDR1** (multidrug resistance protein 1)

- P-glykoprotein, který transportuje zejména hydrofobní organické kationty a některá chemoterapeutika (doxorubicin) (Chandra et al. 2004).

#### **MDR2** (multidrug resistance protein 2)

- Transportuje především fosfolipidy (např. fosfatidylcholin) do žluče. Defekt proteinu MDR2 je popisován u široké řady onemocnění, jako je intrahepatální cholestáza těhotných, progresivní intrahepatální familiární cholestáza 3. typu (PFIC3) nebo biliární cirhóza (Trauner et al. 2003).

**Extrahepatální cholestáza (EHC)** (označována také jako obstrukční) bývá způsobena úplnou nebo částečnou mechanickou bloádou průtoku žluči na úrovni hlavních žlučodů (konkrementem, maligním či benigním tumorem, strikturami). Pokud není překážka včas odstraněna, dochází často k nevratným změnám jaterního parenchymu s rozvinutím fibrózy a cirhózy. Změny v expresi transportéru BSEP bývají minimální, ale dochází ke zvýšené expresi MRP3 (Rodriguez-Garay 2003). Rovněž bývá na kanalikulární membráně nacházena nižší aktivita transportérů pro ŽK a organické anionty, což má za následek hromadění toxických látek v jaterní buňce, Obr. 9.



Obr. 9: Hepatobiliární transportní systémy při cholestatických stavech.

V levé části obrázku je znázorněna cholestáza indukovaná estrogény (E) a v pravé části cholestáza způsobená podvazem žlučodů (BDL). V obou případech jsou zobrazeny transportéry na sinusoidální i kanalikulární membráně hepatocytu společně s jejich zvýšenou nebo sníženou expresí.

**Estrogeny indukovaná cholestáza** (zástupce intrahepatální cholestázy, IHC)– dochází k redukci exkrece žlučových solí, bilirubinu, fosfolipidů, cholesterolu a  $\text{HCO}_3^-$  prostřednictvím snížení exprese NTCP (pro konjugované žlučové kyseliny) i OATPs (nekonjugované žlučové kyseliny a bilirubin) a MRP2 (přenáší glukuronid, diglukuronid bilirubinu, glutation a bivalentní konjugáty žlučových kyselin). Snížená exprese BSEP nebyla prokázána.

**Cholestáza vyvolaná podvazem žlučových cest** (zástupce extrahepatální cholestázy, EHC)– dochází ke snížené expresi NTCP, OATPs a MRP2 a naopak ke zvýšené expresi MRP3 a MDR1)

NTCP– Na<sup>+</sup>-taurocholátový transportér, OATPs– polypeptid transportující organické anionty, MRP3– basolaterální multidrug rezistentní protein 3, BSEP– pumpa exportující žlučové soli, MDR1 a 2– multidrug rezistentní P-glykoprotein 1 a 2, MRP2– kanalikulární multidrug rezistentní protein 2, AE2– měnič aniontů, BS- soli žlučových kyselin, OA- organické anionty, OC- organické kationty, PC– fosfatidylcholin, GSH– glutathion. Upraveno dle (Rodriguez-Garay 2003).

### **Cholestáza a GSL**

V roce 2007 byly poprvé publikovány změny ve složení a lokalizaci jaterních gangliosidů při cholestáze. Vlivem estrogenu indukované cholestázy dochází v jaterní tkáni ke změně lokalizace GM1 gangliosidu směrem do centrální zóny jaterního lalůčku. Tento jev byl vysvětlen tím, že zvýšená přítomnost membránových glykosfingolipidů zvyšuje membránovou rigiditu. Přesun GM1 gangliosidu směrem k centrální zóně jaterního acinu je pravděpodobně důsledkem škodlivých účinků akumulovaných ŽK při estrogenové cholestáze. Zároveň byla pozorována korelace mezi přesunem GM1 z cytoplasmy do sinusoidálních membrán a sérovou koncentrací žlučových kyselin. Akumulace gangliosidů v membránách může sloužit k ochraně hepatocytů proti detergentním účinkům vysokých koncentrací žlučových kyselin (Jirkovská et al. 2007), podobně protektivní účinek má zřejmě zmnožení biosyntetické b- větve gangliosidů (Majer et al. 2007).



## 1.4. Fixace kryostatových řezů

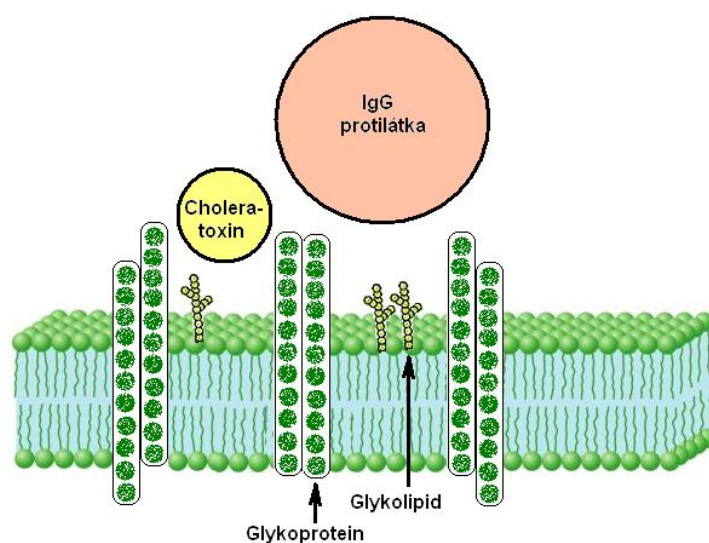
Zásadním úkolem této denaturační procedury je zachování histologické struktury tkáně, protože v důsledku smrti či odebrání biologického materiálu dochází k rychlé autolýze buněk. Tomuto stavu je bráněno fixací chemickými reagensy (chemická fixace) nebo rychlým zamražením tkáně (fyzikální fixace). Výsledkem je inaktivace přítomných katabolických enzymů a koagulace protoplazmy se zvýrazněním vnitřních struktur. Fixační metody využívají různých teplotních profilů, rychlostí fixace či chemických reagensů, jako např. formaldehydu, ethanolu, methanolu, acetonu, kyseliny octové či kyseliny pikrové. Navíc dochází ke zvýšení permeability buněčných membrán s využitím při histochemickém barvení tkáňových preparátů.

V literatuře se uvádí, že fixace gangliosidů je poměrně obtížný proces s protichůdnými argumenty pro zvolení ideální fixační techniky. Často popisovanými komplikacemi jsou ztráta gangliosidů zapříčiněná jejich extrakcí do fixačního média (Šmíd 1991) nebo slabá vizualizace způsobená například „zastíněním“ většími molekulami glykoproteinů a cholesterolu, Obr. 10 (Schwarz et al. 2000).

Gangliosidy jsou dnes nejčastěji detegovány pomocí přímých anti-gangliosidových protilátek a bakteriálními toxiny (např. choleratoxin, tetanotoxin apod.) (Schwarz et al. 1996). Interakce choleratoxinu s GM1 gangliosidem je velice pevná, rychlá a poměrně specifická. Pevnost vazby je určena zejména pentavalentní reakcí jedné B podjednotky choleratoxinu k pěti molekulám gangliosidu GM1. Velkou výhodou této detekce GM1 oproti monoklonálním protilátkám je výrazně lepší komerční dostupnost a nižší pořizovací cena. Naopak jako nevýhoda bývá označována slabá „zkřížená“ reaktivita s jinými gangliosidy (Šmíd F 2011).

Dle dostupných publikací je při experimentech s kryostatovými mozkovými řezy doporučena fixace acetonem při teplotě -20°C po dobu 5 minut. Toto doporučení bylo uděleno po detekci gangliosidů monoklonálními protilátkami třídy IgM. Popsaná fixační technika poskytuje dle

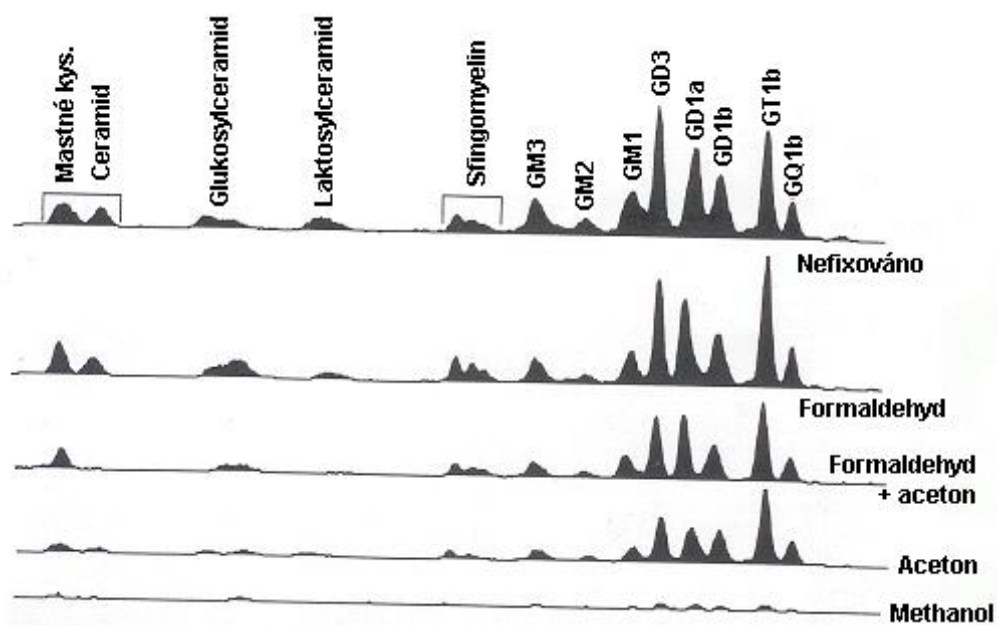
literatury výraznější barvení než užití samotného formaldehydu či detekce protilátkami bez fixace. Aceton má navíc schopnost permeabilizovat buněčné membrány, a tím pomáhá „odmaskovat“ glykolipidy na povrchu buněk (Kotani et al. 1993). Přístupnost anti-gangliosidových protilátek (např. IgG) a menších gangliosid-vázajících komponent je graficky znázorněna na Obr. 10.



Obr. 10: Detekce glykolipidů pomocí protilátek a choleratoxinu. Glykoproteiny a jiné membránové komponenty mohou stericky bránit přístupu protilátek (např. IgG s molekulovou hmotností kolem 150000 g/mol) ke glykolipidům. Menší molekuly vázající glykolipidy (např. choleratoxin s molekulovou hmotností okolo 86000 g/mol) nemají naopak přístup ke glykolipidům tolik omezen. Upraveno dle (Schwarz et al. 2000).

Z experimentů založených na interakci monoklonálních protilátek reagujících se širokým spektrem polysialogangliosidů u kultur hipokampálních neuronů vyplývá, že nejlepší fixační technika je při užití formaldehydu a následně acetonu. Tímto procesem bylo pozorováno výrazné projasnění buněčných těl axonů a dendritů nervových buněk (Schwarz et al. 1997).

Stejný tým autorů zkoumal také pomocí [4,5-<sup>3</sup>H]-dihydrosfinganinu únik nervových gangliosidů do různých fixativ. Hladina gangliosidů po fixaci samotným formaldehydem byla pouze o 10% nižší než u nefixovaných kontrolních buněk. V kombinaci formaldehydu s acetonem byla koncentrace gangliosidů snížena o 46% a po samotném acetonu dokonce o 56%. Významný extrakční účinek fixace formaldehydem a acetonem na gangliosidy byl však v rozporu s předchozím imunohistochemickým pozorováním, kdy tento typ fixace vykazoval po navázání protilátky na glykolipidy nejvyšší projasnění neuronových axonů a dendritů. Autoři tento rozdíl připisují „odmaskování“ glykolipidů acetonem od membránových proteinů a sacharidových částí glykoproteinů. Největší, téměř 100% extrakční efekt na gangliosidy měl v popsaném experimentu methanol, Obr. 11 (Schwarz et al. 1996; Schwarz et al. 1997).



Obr. 11: Analýza [<sup>3</sup>H]-GSL na tenké vrstvě po různých fixacích. Horní denzitometrický záznam zobrazuje glykolipidy v nefixovaných preparátech, které tvoří kontrolu. Vlivem samotného formaldehydu, formaldehydu a acetonu a samotného acetonu dochází ke snížení hladiny gangliosidů o 10, 46 a 56%. Účinkem methanolu gangliosidy téměř ze 100 % vymizí (Schwarz et al. 1997).

Jiné práce poukazují na to, že monoklonální protilátky mohou být při vazbě na GSL stericky blokovány cholesterolem, který je třeba odstranit užitím acetonu nebo methyl- $\beta$ -cyclodextrinu. Výhodu acetonu spatřují autoři v tom, že v něm nejsou glykolipidy a membránové fosfolipidy téměř rozpustné, a toto tvrzení dokumentují reakcí např. choleratoxinu a GM1 gangliosidu (Linqwood C, 2005). Podobné závěry o výhodnější přístupnosti protilátek ke glykolipidům po acetonové fixaci byly publikovány v práci S. Kusunokiho (Kusunoki et al. 1994). Provedeny byly experimenty na mozkových řezech, kdy byla po odstranění cholesterolu také pozorována lepší přístupnost protilátek k fukosyl-GM1 gangliosidu.

Jelikož závěry o doporučených fixačních technikách byly v publikovaných pracech značně rozporuplné (Schwarz et al. 1996; Schwarz et al. 1997; Chark et al. 2004), bylo nutné provést optimalizaci detekce gangliosidů pomocí B podjednotky choleratoxinu *in situ*. Ve většině popsaných experimentů bylo navíc využíváno mozkové nebo neuronální tkáně, ale pro naše účely bylo třeba optimalizovat metodu rovněž pro jaterní tkáň.

## **1.5. Katabolická dráha hemu**

Hemoxygenáza (HMOX, E.C.1.14.99.3) je klíčový mikrozomální enzym katabolické dráhy hemu lokalizovaný primárně v endoplazmatickém retikulu. Produkty této enzymatické reakce jsou oxid uhelnatý (CO), dvojmocné železo a biliverdin (Tenhunen et al. 1968; Tenhunen et al. 1969; Yoshida et al. 1978), který je následně prostřednictvím biliverdinreduktázy (BLVR, E.C.1.3.1.24) přeměněn na bilirubin (Tenhunen et al. 1970). V organismu se vyskytuje ve dvou isoformách, a to HMOX1 a HMOX2. Prvně jmenovaná isoforma přispívá k ochraně vůči oxidačnímu stresu a má inducibilní charakter. Významnými induktory HMOX1 jsou například těžké kovy, volné kyslíkové radikály, lipopolysacharid, UV záření či peroxid vodíku. Kromě toho může být HMOX1 indukována různými léky, jako například kyselinou

acetylsalicylovou, statiny nebo imunosupresivy. Tato isoforma bývá zařazována mezi proteiny tepelného šoku (HSP) a také označována dle své molekulové hmotnosti 32 kDa jako HSP32. Místem nejvyšší bazální exprese tohoto isoenzymu jsou především slezina a jaterní Kupfferovy buňky (Goda et al. 1998).

Druhá isoforma HMOX2 je považována za konstitutivní formu s majoritní expresí v mozkové tkáni, varlatech a cévním řečišti (Maines 1988; Goda et al. 1998). Homologie s HMOX1 ve složení aminokyselin je přibližně 45% a hlavní význam této isoformy je zejména regulace mikrovaskulárního tonu. Popsán byl i gen pro třetí isoformu HMOX3, avšak její existence nebyla spolehlivě prokázána a nejspíše se jedná o pseudogen, který má 90% homologii s HMOX2 (Wunder et al. 2003). Mechanismus účinku tohoto enzymu tkví v rozštěpení  $\alpha$ -methinového můstku hemu, oxidaci uhlíku na **oxid uhelnatý** a otevření tetrapyrolového kruhu. Výsledkem je žlutozelený lineární tetrapyrol biliverdin, který je v cytosolu redukován biliverdinreduktázou na žlutooranžový **bilirubin**. Konkrétně dochází k redukci  $\beta$ -metinového můstku na metylenový. Dalším důležitým krokem je uvolnění iontu železa a jeho následná vazba na ferritin a transferin a v této podobě putuje krevním řečištěm k místu biosyntézy metaloporfyrinů, Obr. 12. Všechny popsané produkty hemové degradační dráhy mají důležité biologické vlastnosti. Jelikož je tato práce zaměřena na problematiku hemoxygenázy a gangliosidů v játrech, budu se nadále věnovat metabolickým pochodům a změnám zejména v této tkáni.

Výše zmíněné metabolické produkty hemoxygenázového systému jsou biologicky aktivní a mají v organismu řadu důležitých funkcí:

- Navzdory tomu, že je bilirubin je ve vysokých koncentracích (>25 mg/dl, 430  $\mu$ mol/l) pro organismus toxický (Vandborg et al. 2012), dochází prostřednictvím redukce biliverdinu k jeho produkci. Důvod je takový, že narozdíl od polárního biliverdinu je bilirubin schopný prostou difúzí či specifickým transportním systémem prostupovat

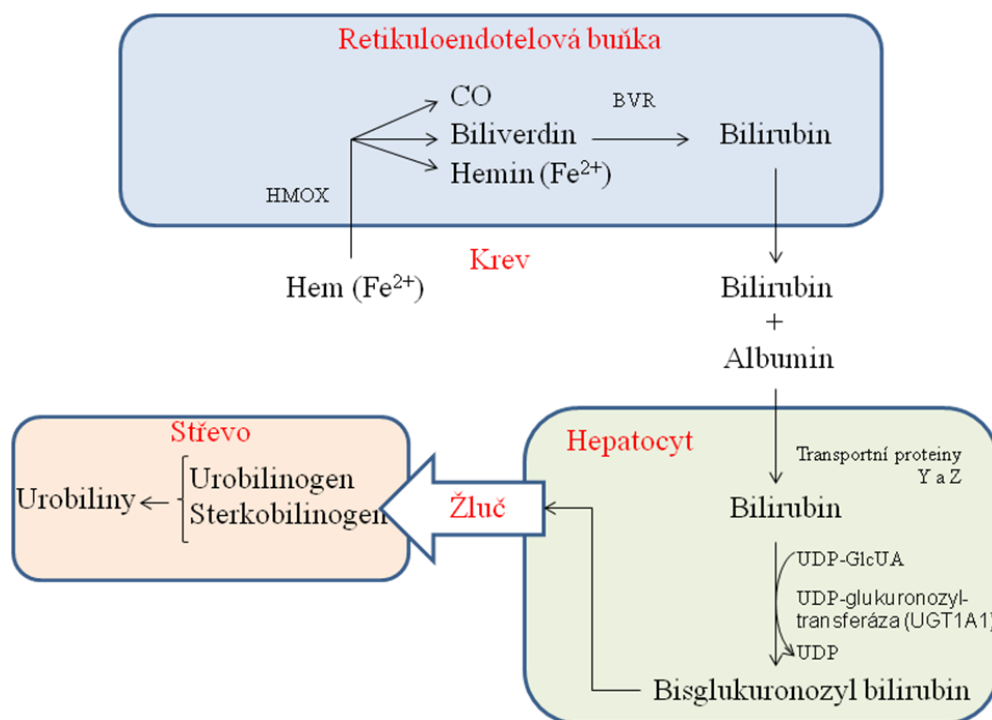
placentární bariérou a nedochází tak během těhotenství k akumulaci biliverdinu u plodu (Lester et al. 1963; Schenker et al. 1964; Schmid 1976). Další velice důležitou funkci plní bilirubin v ochraně před volnými kyslíkovými radikály prostřednictvím redoxního cyklu zahrnující oxidaci bilirubinu na biliverdin a zpětnou redukci biliverdinu na bilirubin (Baranano et al. 2002). Popsaný cyklus vytváří z bilirubinu, i přes nízkou mikromolární koncentraci, velice účinnou endogenní antioxidačně působící látku. Kyselina močová jako další endogenní antioxidant má plazmatickou koncentraci cca 20x vyšší, avšak rychlost reakce s peroxylovými radikály je přibližně třetinová. Navíc denní produkce bilirubinu (250–300 mg/den) cca 4x převyšuje doporučenou denní dávku vitamínu C (60 mg/den) a 20–30x vitamínu E (10 mg/den). Bilirubin působí konkrétně jako „odstraňovač“ (scavenger) singletového kyslíku, reaguje se superoxidovými radikály či je substrátem pro peroxidázy v přítomnosti peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů (Stocker et al. 1987; Wu et al. 1991; Vitek et al. 2007).

- Podobně jako bilirubin je oxid uhelnatý ve vysokých koncentracích značně jedovatý a ochotně reaguje s bílkovinami, které obsahují hem, jako například hemoglobin, myoglobin, kataláza či peroxidáza. Díky vysoké afinitě CO k hemoglobinu dochází k vytvoření karbonylhemoglobinu, čímž je zabráněno potřebnému transportu kyslíku z plic do okolních tkání. Naopak při nižších koncentracích působí CO jako signální molekula. Jedná se o malou hydrofobní molekulu, která dobře difunduje přes buněčnou membránu a váže se na receptory uvnitř buněk (Mutterlini 1998; Ryter et al. 2002). Tímto mechanismem je aktivována např. syntáza oxidu dusnatého (EC 1.14.13.39) s následnou produkcí oxidu dusnatého (NO) nebo solubilní guanylátcykláza (EC 4.6.1.2) a vznik cyklické formy guanosinmonofosfátu (cGMP). Tato forma inhibuje vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a naopak podporuje jeho vychytávání

v mitochondriích. Výsledkem je snížení cytoplasmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a buňka hladkého svalu na tento stav odpovídá relaxací (Liu et al. 2003). Na tomto principu dochází například k regulaci krevního tlaku (Marek J. 2010) nebo podpoře produkce a toku žluči (Sano et al. 1997). Jiná důležitá signální cesta, která je zásadní pro signální transdukcii stresové a zánětlivé odpovědi, je aktivována prostřednictvím mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPKs). Rovněž biliverdin, a prostřednictvím BLVR také bilirubin, se podílí na regulaci jedné z hlavních MAPK signálních cest (MEK/ERK/Elk), která je důležitá pro kontrolu genové transkripce po působení např. oxidačního stresu (Lerner-Marmarosh et al. 2005; Gibbs et al. 2012). Prostřednictvím výše popsaných účinků může CO významným způsobem ovlivnit široké spektrum chorob, jako jsou onemocnění oběhové soustavy, cholestatické stavy, nemoci jater či žlučových cest (Motterlini 1998; Motterlini 2005; Vanova et al. 2014).

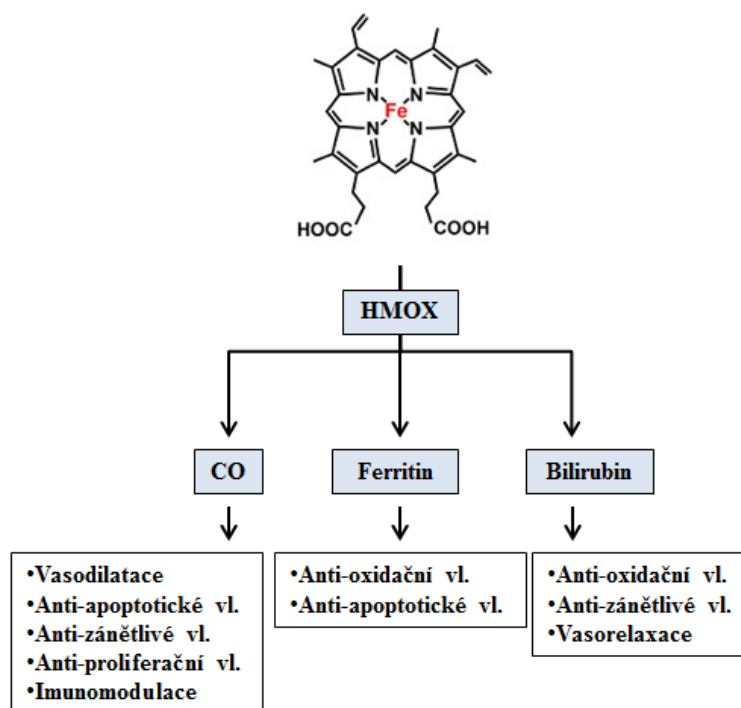
- Třetím produktem je železo, které ve volné formě působí na organismus toxicky a jako silný prooxidant má za následek poškození orgánů. Podstatou je účast  $\text{Fe}^{2+}$  ve Fentonově reakci, kdy se rozkládá peroxid vodíku za produkce reaktivního hydroxylového radikálu, který může poškozovat membrány, proteiny nebo DNA buněk. Část  $\text{Fe}^{2+}$  je vychytávána ferritinem a díky feroxidázové aktivitě H podjednotky je dále oxidována na zásobní formu železa,  $\text{Fe}^{3+}$ . Další část se naváže na transportní protein transferin a touto formou putuje krevním řečištěm k místům s potřebnými transferinovými receptory. Po vazbě na receptory následuje buď zabudování do hemu, nebo uložení do zásobní formy. Vazba na transportní protein a vznik ferritinu dodávají železu cytoprotektivní vlastnosti, kterými na organismus působí. Dalším cytoprotektivním aspektem je zvýšení aktivity ATPázové pumpy, jež podporuje eliminaci intracelulárního železa (Ferris et al. 1999).

Vlastnosti produktů katabolické dráhy hemu jsou přehledně znázorněny na Obr. 13.



Obr. 12: Katabolická dráha hemu. Počátek degradační dráhy hemu je v buňkách retikuloendotelového systému (především játra a slezina), kde se štěpí  $\alpha$ -methinový můstek hemu za současné oxidace uhlíku na oxid uhelnatý, vzniku železnatých iontů a biliverdinu. Biliverdin je cytosolickou biliverdinreduktázou (BLVR) redukován na bilirubin, který se v krevním řečišti váže na albumin. Bilirubin je následně transportován pomocí proteinů Y a Z do hepatocytů, kde dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou za vzniku bisglukuronozyl bilirubinu. Tato konjugovaná forma přechází žlučí do střeva a vznikají barevné urobiliny. Upraveno dle (Brůha et al. 2014).





Obr. 13: Degradací dráha hemu a vlastnosti jejích biologicky aktivních produktů. Hem prostřednictvím svého rychlost limitujícího degradačního enzymu, hemoxygenázy, vytváří biologicky aktivní produkty CO, železo a bilirubin. Oxid uhelnatý má významné antiapoptotické, protizánětlivé a vasodilatační vlastnosti. Ferritin se podílí na antiapoptotických a antioxidačních vlastnostech, stejně jako bilirubin.

Biologický význam HMOX je dána především její enzymovou aktivitou, ale i působením jako signální molekuly aktivující např. MAPKs.

Všechny výše popsané mechanismy jsou ve výsledku odpovědě za cytoprotektivní účinky HMOX1.

## **2. CÍLE**

### **2.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky choleratoxinu *in situ***

Tato část práce měla za úkol nalézt co nejlepší metodické podmínky pro imunohistochemickou detekci gangliosidu GM1, který je považován za zástupce GSL rodiny. Publikovaná data týkající se vhodnosti různých fixačních technik a nežádoucí extrakce gangliosidů z tkání do fixačních roztoků jsou často protichůdná. Důležité je proto porovnání jak různých roztoků, časů a teplot fixace, tak účinnosti extrakce glykolipidů ze tkání s odlišným složením polárních lipidů, jako jsou například játra a mozková tkáň, která obsahuje větší množství glykosfingolipidů.

Cílem této části práce bylo najít fixační činidlo, které bude ze zpracovávaných tkání minimalizovat extrakci glykosfingolipidů a potvrdit či vyvrátit hypotézu, že cholesterol může stericky blokovat detekci glykolipidů, a proto je ho třeba z preparátů odstranit.

### **2.2. Vliv modulace HMOX na obsah a složení glykosfingolipidů v jaterní tkáni při cholestáze indukované estrogény**

Glykolipidy v odpovědi na cholestatické účinky estrogenů mění v hepatocytu své složení a distribuci. Pozorováno bylo významné zvýšení celkových jaterních GSL a zmnožení jejich biosyntetické b- větve. Tento děj byl zároveň doprovázen zvýšeným přesunem GSL z cytoplasmy do sinusoidální membrány, což mimo jiné způsobí zvýšení membránové rigidity. Cholestáza je doprovázena poklesem membránové fluidity, na což hepatocyty reagují zvýšeným přesunem glykolipidů z cytoplasmy do sinusoidální membrány.

Výsledky této části měly odpovědět na otázku, zda se na těchto změnách podílí i oxidační stres. Naší hypotézou bylo, že indukce HMOX u cholestatických zvířat vede ke snížení

oxidačního stresu a tím i redukcí změn v distribuci nebo syntéze GSL vyvolaných tímto mechanismem.

### **2.3. Změny ve složení a distribuci glykolipidů u obstrukční cholestázy**

Extrahepatálního modelu cholestázy bylo docíleno mikrochirurgickým podvázáním segmentálních jaterních žlučových vodů. Dle našich předpokladů by mělo být cholestatické jaterní poškození mnohem větší než u intrahepatální cholestázy indukované estrogeny. Protože se jedná o odlišné typy cholestázy, byla data mezi sebou porovnána.

Cílem této části práce bylo potvrzení či vyvrácení hypotézy, že vlivem obstrukční cholestázy dochází k výraznějším změnám ve složení a distribuci glykosfingolipidů. Na základě získaných dat by mělo být možné rozhodnout, zda jsou pozorované změny specifické pro některý typ cholestázy, nebo se jedná o obecnější mechanismus.

### **2.4. Vliv modulace HMOX na obstrukční cholestázu**

Při obstrukční cholestáze dochází v jaterních buňkách k akumulaci prooxidačně a detergentně působících žlučových kyselin s následným rozvojem oxidačního stresu, vznikem volných kyslíkových radikálů a spuštěním signální kaskády vedoucí k nekróze buněk.

Cílem této části práce bylo zjistit, zda hromadění bilirubinu, endogenního antioxidantu a zároveň produktu katabolické dráhy hemu, může do určité míry chránit játra před prooxidačním účinkem nahromaděných žlučových kyselin a zda se tento účinek (podobně jako u estrogeny indukované cholestázy) promítne do obsahu jaterních gangliosidů.

### 3. METODICKÁ ČÁST

#### 3.1. Materiál

K experimentům byly využity samice potkana kmene Wistar (200-250g) získané od firmy Anlab (Praha, ČR) a zpracovávaným materiálem byla zejména krev a jaterní tkáň. Zvířata měla volný přístup k potravě i vodě po celou dobu experimentu a byla chována za standardních podmínek (kontrolovaná teplota v místnosti 22°C, střídající se cykly 12h světlo/12h tma). Všechny protokoly pro práci s experimentálními zvířaty byly schváleny etickou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Cholestáza byla indukována každodenní subkutánní aplikací 17 $\alpha$ -etinylestradiolu (EE, 5 mg/kg) rozpuštěném v 1,2-propandiolu po dobu 18 dnů (skupina byla označena jako **E**), zatímco kontrolní skupině (**C**) byl podáván pouze 1,2-propandiol. Modulace HMOX bylo navíc u cholestatických zvířat dosaženo intraperitoneální aplikací hemu ve formě netoxického methemalbuminu (aktivace HMOX– skupina **aE**) nebo SnMP (inhibice HMOX– skupina **iE**) v koncentraci 15  $\mu$ mol/kg ve 4 dávkách, a to ve dnech 0, 5, 10 a 15. Minimální počet zvířat v každé experimentální skupině byl n= 6.

Po intramuskulární anestezii ketaminem (90 mg/kg) a xylazinem (10 mg/kg) byla odebrána krev z dolní duté žíly pro biochemické analýzy. Následovalo odebrání jater, která byla zvážena a okamžitě připravena pro histochemické zpracování, izolaci celkových i jednotlivých gangliosidů, izolaci RNA a stanovení HMOX aktivity.

Jako zvířecí model pro cholestázu indukovanou podvazem segmentálních žlučvodů byly opět zvoleny samice potkanů kmene Wistar (200–250 g) získané od firmy Anlab (Praha, ČR). Cholestatického efektu bylo docíleno mikrochirurgickým podvázáním segmentálních jaterních žlučvodů (skupina **BDL**) po dobu 5 dnů. Tento typ podvazů umožňuje rozložení tlaků ve žlučovodech a s tím související minimalizaci rizika ruptury intrahepatálních žlučvodů a vzniku peritonitidy. Kontrolní skupině byla provedena laparotomie (skupina **SO**),

aktivace HMOX bylo dosaženo intraperitoneální aplikací hemu ve formě methemalbuminu (**aBDL**: 30  $\mu\text{mol/kg}$  ve 2 dávkách, a to ve dnech 0 a 3) a inhibice HMOX podáním SnMP (**iBDL**: 15  $\mu\text{mol/kg}$ , intraperitoneálně podán 1. den). Minimální počet zvířat v každé experimentální skupině byl  $n=6$ .

Následná manipulace se zvířaty a získaným materiálem byla shodná jako u cholestázy indukované estrogény. Rovněž byly dodrženy veškeré aspekty práce s laboratorními zvířaty a protokoly byly schváleny etickou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

### **3.2. Přístrojové vybavení**

ABI Prism 7900 pro qPCR (AME Bioscience A/S, Norsko)

Analytické váhy GR 202 (A&D Instruments, Japonsko)

Centrifuga Beckman GPR (Beckman, Fullerton, CA, USA)

Densitometr Camag TLC Scanner II (Muttentz, Switzerland)

Fotoaparát Canon A620 (Canon Inc, Tokyo, Japonsko)

Lyofilizátor Christ  $\alpha 1-4$  (B. Braun Biotech. International, Melsungen, SRN)

Magnetická míchačka Variomag MONO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Mikroskop Leitz Diaplan (Wild Leitz GmbH, Wetzlar, SRN)

Modular analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN)

Odparka RVO 200A (Ingos, Praha, ČR)

Orbitální třepačka KM3 (Edmund Bühler, UK)

PH metr TetraCon 325 (Thomas Scientific, SRN)

Předvážky Kern 572 (Balingen, SRN)

Sonikátor XL (Microsonix incorporated, Farmingdale, NY, USA)

Spektrofotometr Lambda 20 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)

Spektrofotometr ND-1000, NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)

Spektrofotometr Specol 11 (Carl Zeiss, Jena, SRN)

Sušárna HS 61A (SDT Technika, Praha, ČR)

Termocykler TC-512 (Techne, Burlington, NJ, USA)

Termostat (Lab. Systém, Praha, ČR)

Třepačka KM3 (Edmund Bühler, Hechingen, SRN)

Ultrazvukový homogenizátor Microson XL 2000 (Misonix, Farmingdale, USA)

Vortex Genie-2 (Scientific Industries, USA)

Obrazová analýza byla vyhodnocována programy ACC od firmy SOFO, Praha, ČR a Olympus Cue 2 (Tokio, Japonsko)

### **3.3. Chemikálie**

17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2,2-azobis(2-amidinopropan) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

4-Chloro-1-naphtol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Albumin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Avidin (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Bile Acid Controls (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA)

Bile Acid reagent A (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA)

Bile Acid reagent B (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA)

Bile Acids Calibrator Set (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA)

Biotin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Cyklohexan (Penta, Praha, ČR)

D7-cholesterol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia, Stockholm, Švédsko)

Diaminobenzidín tetrahydrochlorid (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Praha, ČR)

GM1 standard (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hemin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, MA, USA)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

HPTLC desky (Merck, Darmstadt, SRN)

Hydroxid draselný (Penta, Praha, ČR)

Hydroxid sodný (Penta, Praha, ČR)

Chlorid draselný (Penta, Praha, ČR)

Chlorid sodný (Penta, Praha, ČR)

Chlorid vápenatý (Penta, Praha, ČR)

Chloroform (Penta, Praha, ČR)

Chloroform (Penta, Praha, ČR)

Choleratoxin B značená biotinem (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Choleratoxin B značený peroxidázou (List laboratories, Campbell, CA, USA)

Kyselina N-acetylneuraminová kyselina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kyselina octová (Penta, Praha, ČR)

Mesoporfyrin cínu (SnMP) (Frontier Scientific, Newark, DE, USA)

Methanol (Penta, Praha, ČR)

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Montovací médium Faramount (Dako, Glostrup, Dánsko)

N, N-dimethylformamid (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

N, O bis(trimethylsilyl)acetamid (Merck, Darmstadt, SRN)

Octan amonný (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Orcinol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

PAP pen pro imunostanovení (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Peroxid vodíku 30% (Penta, Praha, ČR)

Petrolether (Penta, Praha, ČR)

Poly(isobutyl methacrylate) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Propan-1,2-diol (Penta, Praha, ČR)

Resorcinol (Merck, Darmstadt, SRN)

RNA later (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Silikagel (Merck, Darmstadt, SRN)

STOP reagent (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA)

Streptavidin peroxidázový polymer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, MA, USA)

Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, Kanada)

Tris base (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Trolox (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### **3.4. Příprava používaných roztoků**

- **4% formaldehyd-** vždy čerstvě připraven depolymerizací 4 g paraformaldehydu, který byl rozpuštěn v 80 ml vody. Suspenze byla za stálého míchání zahřáta k bodu varu a do úplného rozpuštění paraformaldehydu byl přikapáván 1M NaOH. Nakonec bylo přidáno 20 ml 10x PBS. Vzniklý roztok byl před použitím přefiltrován a pH bylo upraveno na hodnotu 7,4.



- **10x PBS (40 mM)**– v 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 15,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Po úplném rozpuštění byl roztok doplněn do 1 l vodou a pH bylo upraveno na hodnotu 7,2-7,4.
- **ABAP= 2,2-azobis(2-amidinopropan) (400 mM)**– 108 mg bylo rozpuštěno v 1 ml 40 mM PBS a před měřením se roztok 4x ředí.
- **Bakerův roztok**– ve 225 ml vody byl rozpuštěn 1 g  $\text{CaCl}_2$  a dále bylo přidáno 25 ml neutrálního formolu.
- **Bezvodý aceton**– do 1 l acetonu bylo přidáno 100-150g bezvodého  $\text{CaCl}_2$  a suspenze se nechala stát v uzavřené nádobě za občasného promíchání. Dále byla kapalina dekantována a predestilována pod zpětným chladičem. Díky trubici s  $\text{CaCl}_2$  docházelo k odstranění vzdušné vlhkosti.
- **Dipyridamol (5 mM)**– 5 mg látky bylo rozpuštěno ve 2 ml ethanolu.
- **EDTA**– 73 mg látky bylo rozpuštěno v 50 ml 10 mM PBS.
- **Resorcinolové činidlo**– 5 ml 2% resorcinolového roztoku bylo smícháno se 40 ml koncentrované HCl a 0,125 ml 0,1 M  $\text{CuSO}_4$ . Roztok byl doplněn do 50 ml destilovanou vodou a výsledné činidlo bylo uskladněno při 8°C v tmavé láhvi.
- **Orcinolové činidlo**– smícháno bylo 22,2 ml ethanolu, 2,9 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 125 mg orcinolu. Činidlo bylo skladováno v tmavé láhvi při 8°C.
- **Mesoporfyrin cínu**– 101,6 mg mesoporfyrinu cínu bylo rozpuštěno v 1,521 ml 0,1 M NaOH, 1,673 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 16,224 ml zásobního roztoku BSA (250 mg BSA+20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Roztok byl dále doplněn vodou na 26 ml a pH bylo upraveno na hodnotu 7,4.
- **Methemalbumin**– 9,9 mg heminu bylo rozpuštěno ve 2,5 ml 0,4 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Dále byla přidána voda do celkového objemu 8 ml, 100 mg BSA a pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. Nakonec byla přidána destilovaná voda na konečný objem 10 ml. (Vreman et al.

1988). Hem byl vždy podáván ve formě methemalbuminu (1,5 mM hemu na 0,15 mM albuminu).

- **4-chloro-1-naftol**– 5 mg chloro-1-naphtolu bylo smícháno se 1,5 ml methanolu, 7,5 ml 0,2 M Tris-HCl pufru o pH 7,4 a 4 µl 30% peroxidu vodíku.
- **Sephadex DEAE A-50**– 15 g anexu bylo smícháno s 500 ml směsí B (chloroform:methanol:0,8 M octan amonný, 30:60:80). Supernatan byl odlit a sediment byl smíchán s novou směsí B. Proces byl ještě jednou opakován a nakonec se nechala směs přes noc ekvilibrovat.
- **Silikagel 60**– k 5 g silikagelu se přidalo 20ml směsi D a centrifugací po dobu 10 minut (2500 ot/min) se směs zbaví nečistot. Tento proces se opakuje 4x a následně byl silikagel za stejných podmínek promyt směsí A, centrifugován a uskladněn v lednici.
- **Směs A**– chloroform:methanol:voda 30:60:8.
- **Směs B**– chloroform:methanol:0,8 M octan amonný 30:60:8.
- **Směs C**– 0,2 M octan amonný v methanolu.
- **Směs D**– chloroform:methanol:2,5 M hydroxid amonný 30:60:8.
- **Trolox (10 mM)**– 5 mg látky se rozpustilo ve 2 ml ethanolu.

### 3.5. Metodické postupy

#### 3.5.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky choleratoxinu in situ

##### 3.5.1.1. Kvantifikace ztrát GM1 gangliosidu během acetonové fixace

Z jaterní tkáně každého potkana bylo nakrájeno 12 kryostatových řezů o tloušťce 6 µm a tyto řezy byly přeneseny na laboratorní sklíčko, kde byl imunochemicky testován účinek fixačních roztoků za různých podmínek. Celkem bylo vyčleněno 16 kontrolních laboratorních zvířat (n=

16), která byla rozdělena do následujících skupin pro testování extrahovatelnosti GM1 z řezů,  
Obr. 14:

A) kontrolní skupina, ve které byl vlivem chloroform:methanol:vody (C:M:V) v poměru 10:10:1 GM1 ze 100% vyextrahován, n= 4

B) testování vlivu acetonu při teplotě 25°C, n= 6

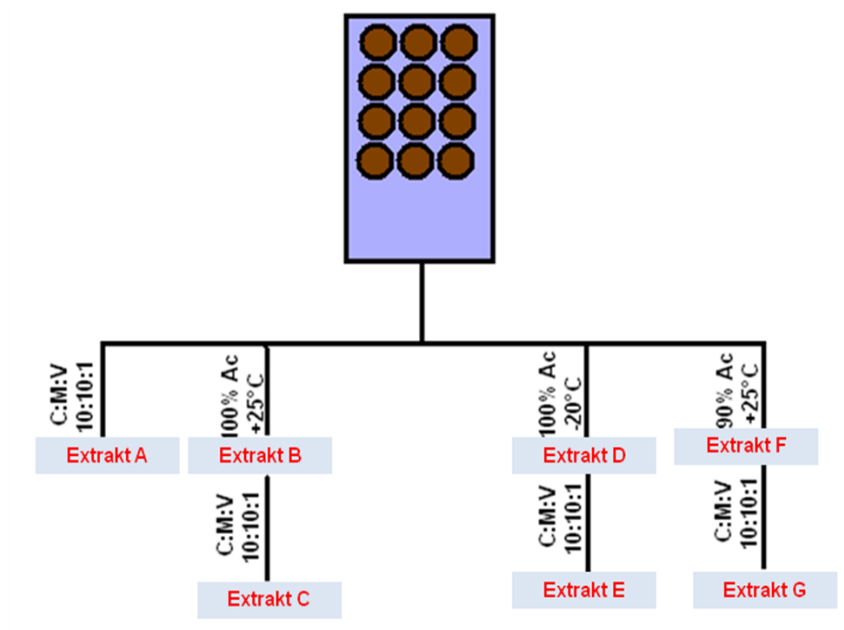
C) po předešlé extrakci (skupina B) byly řezy re-extrahovány C:M:V, n= 6

D) testování ledového acetonu při teplotě -20°C, n= 3

E) po předešlé extrakci (skupina D) byly řezy re-extrahovány C:M:V, n= 3

F) testování 10% vodné složky v acetonu při teplotě -20°C, n= 3

G) po předešlé extrakci (skupina F) byly řezy re-extrahovány C:M:V, n= 3



Obr. 14: Vliv extrakčních činidel na gangliosid GM1. Působením C:M:V a acetonu za různých podmínek byly z kryostatových jaterních řezů získány extrakty A-G, ve kterých se následně pomocí imunochemické detekce kvantifikoval GM1.

Všechny získané extrakty byly odpařeny při 45°C pod dusíkem, rozpuštěny v chloroform:methanolu 1:1 (C:M) a společně se standardem GM1 naneseny na HPTLC alufolie silikagelu. Jako mobilní fáze byla zvolena směs chloroform:methanol:0,2% CaCl<sub>2</sub> v poměru 50:45:11 a získaný chromatogram byl následně rozstřížen na dvě části. První část podstoupila reakci s orcinolovým činidlem pro detekci standardu GM1 (105°C, 5 minut). Informace sloužila pouze pro orientační představu o rozložení gangliosidů v nanesených vzorcích. Druhá část chromatogramu byla z důvodu úspory protilátek zmenšena a 75 vteřin impregnována 0,1% polyisobutylmetakrylátem v cyklohexanu. Aby nedocházelo k odlupování silikagelové vrstvy, byly okraje navíc zpevněny 1% polyisobutylmetakrylátem. Nespecifické vazebné interakce byly 15 minut blokovány 1% BSA v PBS. TLC folie byla při pokojové teplotě po dobu 30 minut přenesena do roztoku B podjednotky cholera toxinu značené biotinem (ředěno 1% BSA v poměru 1:300). Následovalo intenzivní 5krát opakované promývání chromatogramu v PBS po dobu 5 minut a na biotin se navázal komerční komplex streptavidin-polymer-peroxidázy (ředěno 1% BSA v poměru 1:400). Po 60 minutách byl chromatogram opět promyt v PBS. GM1 gangliosid byl detegován roztokem 1-chlor-naftolu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a citrátového pufru o pH= 7,2. Celý proces imunodetekce byl proveden za využití orbitální třepačky (100 cyklů za minutu). Denzitometrická analýza chromatogramu byla uskutečněna při reflektanci 580 nm a výsledky byly využity k výpočtu procentuálního zastoupení GM1 jak v acetonových, tak v C:M:V re-extraktech.

### **3.5.1.2. Stanovení gangliosidů po acetonové extrakci z lyofilizovaných homogenátů**

Homogenáty byly připraveny nastříháním a sonikováním 1 g jaterní nebo 0,5 g mozkové tkáně v 3 ml směsi C:M:V o poměru 4:8:3, 2 dny lyofilizovány a poté rychle přeneseny do exsikátoru, aby se zabránilo kondenzaci vzdušné vlhkosti. Ve vlastním experimentu byly vzorky rozděleny do tří skupin:

- vzorky (n= 6) byly 15 minut extrahovány při pokojové teplotě 5 ml směsí C:M:V v poměru 4:8:3, proces byl ještě 2x zopakován a jednotlivé extrakty byly spojeny do jednoho, který reprezentoval 100% extrahované gangliosidy (= **extrakt A**).
- vzorky (n= 6) byly 15 minut extrahovány 5 ml bezvodého acetonu při pokojové teplotě (= **extrakt B**).
- vzorky po acetové extrakci byly 15 minut re-extrahovány při pokojové teplotě 5 ml směsí C:M:V (4:8:3) (n= 6), re-extrakt skupiny B). Proces byl opět 3x zopakován a jednotlivé extrakty byly spojeny do jednoho výsledného (= **extrakt C**).

Extrakty byly pod dusíkem při teplotě 45°C odpařeny a rozpuštěny v 500 ul směsí C:M:V (4:8:3). Gangliosidy byly z jednotlivých extraktů izolovány v několika krocích zahrnující ionexovou DEAE chromatografii, destrukci alkalilabilních fosfolipidů, dialýzu a přečištění na koloně silikagelu (Ledeen, 1973). Celkové gangliosidy, respektive celková lipidní kyselina sialová, byly v extraktech fotometricky měřeny za využití resorcinolového činidla (Svennerholm 1957).

### **3.5.1.3. Chromatografie gangliosidů na DEAE anexu**

Za anex byl zvolen Sephadex DEAE A-50, který od sebe odděluje kyselé (gangliosidy, fosfolipidy, sulfamidy) a neutrální lipidy. Skleněná kolona s fritou o průměru 1 cm byla promyta směsí A, naplněna připraveným anexem do výšky 2,5 cm a na anex byl aplikován veškerý získaný vzorek. Po protečení extraktů byly kolony promyty 20 ml směsí A a 5 ml methanolu. Gangliosidy byly nakonec eluovány 20 ml směsí C.

#### **3.5.1.4. Destrukce alkalilabilních fosfolipidů alkalickou metanolýzou, dialýza a lyofilizace**

K extraktu byly přidány 2 ml 1M NaOH v methanolu a extrakty byly 60 minut temperovány při 37°C. Směs byla poté neutralizována 2 ml 1M kyseliny octové v methanolu, který byl následně za použití vakuové odparky (60°C a 60 minut) odstraněn. Vzniklý odparek byl rozpuštěn v 10 ml vody a tím připraven na dialýzu proti vodě, která trvala 4 dny při 4°C. Během této doby byla voda několikrát vyměněna a vzorky byly následně přes noc lyofilizovány. Alkalická metanolýza byla zvolena pro odstranění zejména fosfolipidů, u kterých dochází vlivem alkalického prostředí k hydrolyze esterové vazby. Gangliosidy jsou vzhledem k přítomné amidové vazbě stabilní. Následnou dialýzou byly odstraněny hydrolyzované fosfolipidy, zatímco makromolekulární micely z gangliosidů dialyzační membránou neprošly. Přebytečná voda ve vzorku po dialýze byla odstraněna dlouhodobou lyofilizací.

#### **3.5.1.5. Přечиštění gangliosidů na koloně silikagelu**

Silikagel byl nalit do kolonky do výšky 2,5 cm a promyt 10 ml chloroform:methanolu v poměru 2:1 a redestilovaným chloroform:methanolem v poměru 95:5. Na takto připravený silikagel byl nansen 1 ml rozpuštěného vzorku ve směsi chloroform:methanol o poměru 1:1 a doplněn chloroformem na konečný poměr chloroform:methanol 4:1. Přечиštěné gangliosidy byly eluovány 20 ml chloroform:methanolu v poměru 2:1 a odpařeny pod dusíkem.

#### **3.5.1.6. Fotometrické stanovení celkových gangliosidů**

Do reakce bylo použito 20 µl vzorku přечиštěných gangliosidů, 200 µl vody a 200 µl resorcinolového činidla. Směs byla inkubována při 100°C ve vodní lázni a po 15 minutách byly vzorky ochlazeny ponořením do studené vody. Do každé zkumavky bylo přidáno 0,6 ml

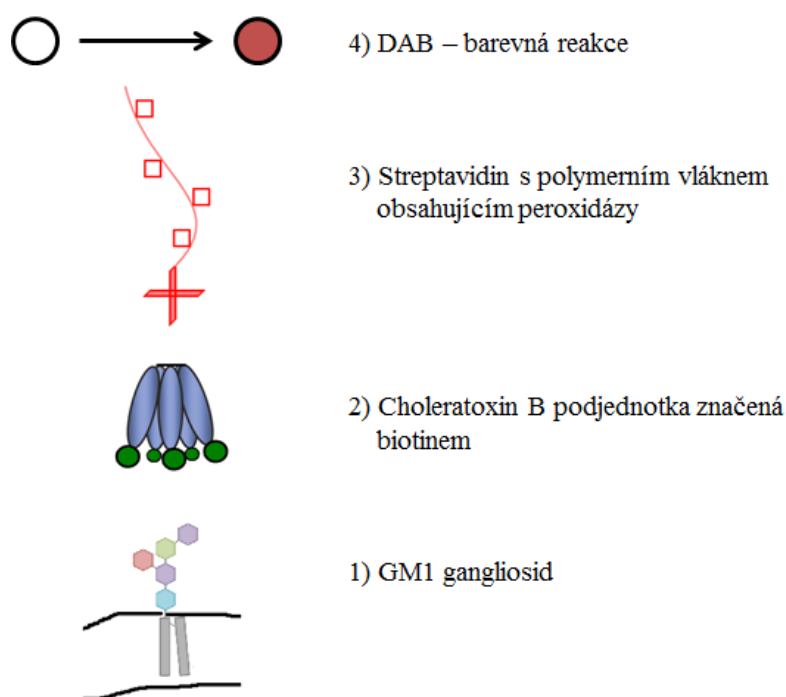
směsi butylacetát:butanol (85:15) a celkové gangliosidy byly měřeny fotometricky při vlnové délce 580 nm.

### **3.5.1.7. Histochemická detekce GM1 v játrech**

Kryostatové řezy potkaních jater byly nakrájeny na konstantní tloušťku 6  $\mu\text{m}$ , sušeny přes noc a dále fixovány čerstvě připraveným 4% formaldehydem po dobu 5 minut při pokojové teplotě a acetonem za různých podmínek. Vliv teploty a doby fixace na GM1 extrakci bezvodým acetonem byl zjišťován při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  a pokojové teplotě vždy ve dvou časových intervalech 2 a 15 minut. Vliv obsahu vodné složky v acetonu byl studován použitím směsi aceton:voda v poměru 9:1 při  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut. Fixované řezy byly rychle přeneseny do exsikátoru, aby nedošlo ke kondenzaci vody ze vzdušné vlhkosti na vychlazená mikroskopická sklíčka s řezy. Histochemická detekce GM1 byla provedena modifikací popsaného postupu (Jirkovská M, 2007) pomocí B podjednotky choleratoxinu značené biotinem. Ve zmíněné publikaci užívali ředění CHT-B v poměru 1:250 s dobou reakce 60 minut při pokojové teplotě. Naše modifikace spočívala v určení nového stupně ředění B podjednotky choleratoxinu a odlišné doby inkubace řezů (Petr et al. 2010). V experimentech jsme, s ohledem na úsporu reagensů, užili nové ředění 1:300 s dobou inkubace 16,5 hod při  $8^{\circ}\text{C}$ . Endogenní peroxidasová aktivita byla 15 minut blokována inkubací 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PBS s rozpuštěným 0,1% azidem sodným. Endogenní biotin byl 10 minut blokován 0,1% avidinem v PBS a řezy byly následně 3x po 5 minutách opláchnuty v PBS. Zbytkový avidin byl odstraněn reakcí pomocí 0,01% biotinu v PBS a řezy byly 3x opláchnuty opět v PBS. Nespecifické vazebné interakce byly 15 minut blokovány 3% BSA v PBS. Popsaný proces probíhal na orbitální třepačce při otáčkách 100 cyklů za minutu. Kryostatové řezy byly následně inkubovány naředěnou B podjednotkou choleratoxinu v 3% BSA o ředění 1:300 a inkubovány při  $8^{\circ}\text{C}$  po dobu 16,5 hod. Dále byly řezy 3x po 5 minutách proprány v PBS a 60

minut inkubovány při pokojové teplotě komerčním streptavidin-peroxidázovým polymerem naředěným PBS v poměru 1:400. Následovalo poslední opláchnutí PBS a vizualizace peroxidázové aktivity pomocí tablet tetrahydrochloridu diaminobenzidinu (DAB). Uvedený reakční krok probíhal 20 minut ve tmě při pokojové teplotě. Vizualizované řezy byly 5 minut proplachovány v destilované vodě a zamontovány montovacím médiem, Obr. 15.

V rámci experimentu byly připraveny rovněž dvě kontroly: 1) byl vynechán krok s choleratoxinem a 2) řezy byly před detekcí GM1 extrahovány při pokojové teplotě po dobu 15 minut C:M (1:1) a C:M:V (1:1:0,3). Výsledky výše popsáných experimentů byly fotografovány pod mikroskopem za konstantních podmínek (světlo 7, clona 4) a vyhodnoceny pomocí analýzy obrazu s denzitometrickým programem Olympus Cue 2.

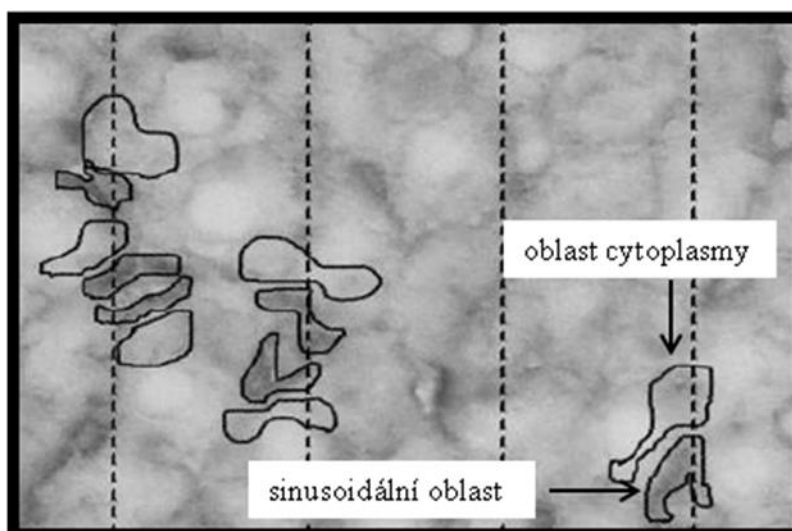


Obr. 15: Schéma imunohistochemické detekce GM1 gangliosidu. Na membránový GM1 se váže B podjednotka choleratoxinu značená biotinem, na kterou se připojí komplex streptavidinu s polymerním vláknem obsahující peroxidázy. Vlastní barevná reakce je zakončena pomocí diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (DAB).



### 3.5.1.8. Denzitometrická analýza GM1 gangliosidu

Nativní kryostatové jaterní řezy z 23 experimentálních potkanů kmene Wistar byly fixovány buď 5 minut čerstvým 4% formaldehydem, nebo 15 minut bezvodým ledovým acetonem. Detekce GM1 byla provedena pomocí B podjednotky choleratoxinu značeného biotinem a vizualizace DAB, jak bylo popsáno výše. Průměrná optická denzita GM1 byla v každém řezu proměřena za stejných podmínek vždy v 70 oblastech při 40 násobném zvětšení objektivu (celkové zvětšení v mikroskopu bylo 500x). Pro výběr vhodných oblastí byla zvolena metoda stratifikovaného náhodného výběru (Hamilton 1995) a pro měření byly vyloučeny poškozené oblasti, trhliny a lumen velkých cév. Kvantifikace získaných mikroskopických dat byla provedena pomocí denzitometrického programu Olympus Cue 2. Analyzovány byly sinusoidální membrány (sin) a přilehlé oblasti cytoplasmy (cyt) hepatocytu a optická denzita reakčního produktu byla stanovena užitím softwaru ACC 6.0 (SOFO, ČR), Obr. 16.



Obr. 16: Analýza obrazu GM1 gangliosidu se zvýrazněním sinusoidální a subsinusoidální cytoplasmatické oblasti.

### **3.5.1.9. Stanovení GM1 v jaterní a mozkové tkáni**

Řezy z jaterní tkáně potkana byly fixovány: 1) 4% formaldehydem; 2) bezvodým acetonem a řezy mozkové tkáně 1) 4% formaldehydem; 2) Bakerovým roztokem; 3) bezvodým acetonem s následnou extrakcí formaldehydem; 4) bezvodým acetonem s následnou fixací Bakerovým roztokem. Bakerův roztok byl pro fixaci mozkové tkáně zvolen proto, že redukuje rozpustnost nepolárních lipidů, které jsou v centrálním nervovém systému zastoupeny ve větším množství. Po fixaci acetonem byly řezy vždy sušeny v exsikátoru. Vlastní histochemická detekce GM1 byla provedena pomocí B podjednotky choleratoxinu značené peroxidázou (ředění 1:500 v PBS s 3% BSA, inkubace 16,5 hodiny při 8°C). Buněčná jádra byla kontrastně značena hematoxylinem. Ostatní stupně detekce byly provedeny dle protokolu popsaného výše s výjimkou blokování biotinu. Odstranění cholesterolu z mozkových řezů bylo dosaženo inkubací řezů s 20 mM methyl- $\beta$ -cyklodextrinem v PBS při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byly řezy omyty PBS a následně fixovány 4% formaldehydem (Petr et al. 2010).

### **3.5.1.10. Stanovení cholesterolu**

Cholesterol byl stanoven v lipidních extraktech jaterních a mozkových vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS), jako vnitřní standard byl použit D7-cholesterol.

K 20  $\mu$ l jaterních a mozkových extraktů bylo přidáno 20  $\mu$ l 5mM vnitřního standardu a estery cholesterolu byly hydrolyzovány 3 ml ethanolu s 390  $\mu$ l 8,9 M KOH po dobu 3 hodin při 37°C. Cholesterol se extrahoval 5 ml hexanu s 2,5 ml vody, hexanová vrstva byla odebrána a odpařena pod dusíkem při 60 °C. Vzniklý odparek se silyloval 50  $\mu$ l N,O bis(trimethylsilyl)acetamidem 30 min při pokojové teplotě. Vzniklé trimethylsilylderiváty cholesterolu se odpařily při 60°C pod dusíkem a rozpustily ve 300  $\mu$ l hexanu. Vlastní detekce byla provedena na GC/MS (Agilent Technologies) s následujícími parametry: teplota nástřiku

a spojení 300°C, průtok helia jako nosného plynu 1 ml/min, split 1:75, nástřik vzorku 3 µl, kolona ValcoBond VB-5, elektronová ionizace, m/z cholesterolu 458,4 a m/z D7-cholesterolu 465,4 (Cohen et al. 1980; Ellerbe et al. 1989).

### **3.5.2. Vlivu modulace aktivity HMOX na obsah a složení GSL v jaterní tkáni potkana po cholestáze indukované estrogy**

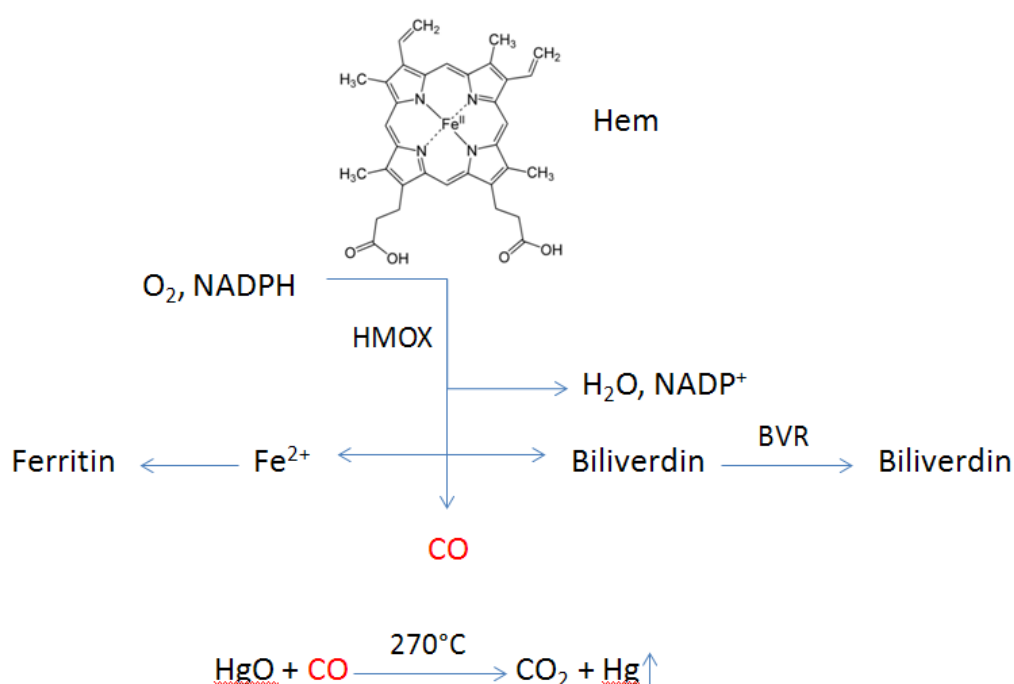
#### **3.5.2.1. Stanovení markerů jaterního poškození**

Stanoveny byly následující markery cholestázy a hepatocelulárního poškození v séru: celkové žlučové kyseliny (ŽK), celkový bilirubin, aktivita alkalické fosfatázy (ALP), aspartátaminotransferázy (AST) a alaninaminotransferázy (ALT). ŽK byly měřeny pomocí komerčního kitu (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA). Principem metody je reakce katalyzovaná enzymem 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenázou (EC 1.1.1.50), kdy dochází k oxidaci žlučových kyselin na 3-oxokyseliny a současně k redukci nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD) na NADH. Vzniklý NADH je opět oxidován nitro blue tyrazoliem (NBT) na NAD za katalýzy enzymem diaphorázou (EC 1.6.4.3). Vzniklý formazan je měřený spektrofotometricky při 530 nm. Intenzita zabarvení formazanu je přímo úměrná množství žlučových kyselin v séru. Ostatní markery jaterního poškození byly stanoveny pomocí automatického analyzátoru (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

#### **3.5.2.2. Stanovení aktivity HMOX**

HMOX aktivita byla měřena metodou plynové chromatografie využívající detekci redukčních plynů (RGA detektor) a UV detekci. Produkovaný CO vznikající rozkladem nadbytku substrátu (hemu) prostřednictvím HMOX byl vyjádřen v jednotkách pikomoly CO/h/mg

čerstvé jaterní tkáň. Čerstvá jaterní tkáň byla v PBS rozstříhána a pomocí ultrazvuku sonikována. Dvacet  $\mu\text{l}$  jaterního sonikátu bylo společně s 20  $\mu\text{l}$  methemalbuminu (150  $\mu\text{M}$ ) a 20  $\mu\text{l}$  NADPH (4,5mM) inkubováno při teplotě 37°C po dobu 15 minut ve vzduchotěsné zkumavce zbavené CO (Vreman et al. 1988). Slepý vzorek obsahoval místo NADPH 0,1 M fosfátový pufr o pH= 7,4 a reakce byla ukončena denaturací 5  $\mu\text{l}$  30% kyseliny sulfosalicylové. Vzniklý CO byl od ostatních redukujících plynů separován na koloně s molekulárním sítem pomocí syntetického vzduchu. CO byl dále detegován RGA detektorem, jenž obsahuje pevný HgO s katalyzátorem ve formě MnO. V průběhu oxidační reakce CO na CO<sub>2</sub> je uvoňována plynná rtuť a její koncentrace je detegována UV detektorem při vlnové délce 254 nm. Jelikož plynná rtuť velice dobře absorbuje v UV oblasti světelného spektra, je tato metoda velmi citlivá a vznikající CO může být měřen v řádu pikomolů, Obr. 17.

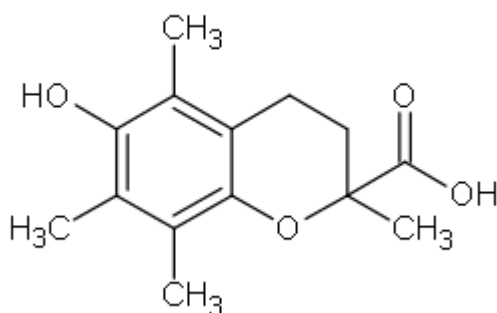


Obr. 17: Degradací dráha hemu a princip stanovení aktivity HMOX. Účinkem HMOX vzniká CO, který je následně oxidován na CO<sub>2</sub> a z reakce se uvolňuje rtuť detegovaná UV detektorem.

### 3.5.2.3. Stanovení antioxidační kapacity séra

Antioxidační kapacita v séru byla měřena fluorimetricky metodou LISAP (Lipoperoxide Scavenging Activity of Plasma) jako podíl ve spotřebě antioxidantu (vyjádřeno lag time) a referenčního a kalibračního antioxidantu, Troloxu, Obr. 18. Metoda využívá zhášení fluorescence dipyridamolu, který obsahuje aromatický kruh, jenž je odpovědný za silný absorpční pás v rozmezí 400 až 480 nm a za samotnou fluorescenci. Reakcí dipyridamolu s peroxylovými radikály vznikajícími tepelným rozkladem azo-indikátoru 2,2-azobis(2-amidinopropan) (ABAP), dochází k lineárnímu poklesu detegované fluorescence. Spotřeba dipyridamolu je blokována v přítomnosti antioxidantu (Iuliano et al. 2000).

Nejprve bylo třeba 5 minut temperovat v kyvetě 2 ml roztoku A (12,5 ml 40 mM PBS, 10 ml 5 mM EDTA, 27,5 ml vody, 200  $\mu$ l 5mM dipyridamol). Po dalších 100 vteřinách se přidalo 50  $\mu$ l 100 mM roztoku ABAP a po dalších 400 vteřinách se do kyvety přidává 50  $\mu$ l Troloxu, nebo vzorku séra. Po celou dobu měření bylo v kyvetě umístěno malé míchadlo, které zajišťovalo lepší homogenitu stanovovaného vzorku.



Obr. 18: Strukturní vzorec Troloxu

### 3.5.2.4. Analýza jaterních gangliosidů

3 g jaterní tkáň byly homogenizovány sonikací v 15 ml methanolu a následně bylo přidáno 15 ml chloroformu. Extrakce probíhala po dobu 30 min na orbitální třepačce, suspenze byla

přefiltrována, zbytek tkáně byl re-extrahován 50 ml C:M:V (30:60:8) a opět filtrován. Spojené filtráty byly doplněny 15 ml methanolu a 4 ml destilované vody, tj. na poměr extrakční směsi C:M:V 30:60:8 (Ledeen et al. 1973; Ueno et al. 1978).

Chromatografie na DEAE aneksu pro oddělení kyselých a neutrálních lipidů, alkalická metanolýza pro odstranění fosfolipidů a konečné přečištění na Silikagelu byly provedeny postupem popsaným výše.

Jelikož má hem i SnMP podobnou pohyblivost při TLC analýze jako gangliosidy, docházelo při denzitometrické kvantifikaci k interferenci, a proto bylo přikročeno k dalšímu přečištění založenému na odlišné polaritě hydrofobních nečistot a hydrofilních gangliosidů (Folch et al. 1957). Vzorky byly rozpuštěny v 1 ml C:M (2:1) a 200  $\mu$ l destilované vody. Po důkladném promíchání byla směs centrifugována (10°C, 2500 ot/min a 5 min), vodná fáze byla přepipetována do nové zkumavy a k organické fázi bylo přidáno 0,4 ml M:V (1:1). Následovala centrifugace za stejných podmínek, ke spojeným vodným fázím byl přidán 1 ml chloroformu a směs byla opět centrifugována. K dalšímu zpracování byla použita vodná fáze gangliosidů, která byla odpařena při 65°C pod dusíkem a rozpuštěna v 80  $\mu$ l C:M (1:1).

#### **3.5.2.5. TLC kvantifikace základních jaterních gangliosidů**

Vyvíjecí komora byla nasycena parami směsi C:M:0,2 % CaCl<sub>2</sub> (50:45:11). Na HPTLC desku bylo nanášeno 5  $\mu$ l přečištěného vzorku (Folch et al. 1957) v šířce 0,5 cm a 4 nmoly standardu GM1 gangliosidu. Po vyvinutí byla HPTLC deska rovnoměrně postříkána resorcinolovým činidlem a následně přikryta druhým sklem a zhřívána při 105°C po dobu 30 min. Gangliosidy obsahující kyselinu sialovou se barví fialově, neutrální lipidy a sulfoglykosfingolipidy naopak hnědě (Svennerholm, 1957). K vlastní detekci analyzovaných gangliosidů se využívá skenovací denzitometrie při 580 nm (software CATs3–Camag, Švýcarsko).

### 3.5.2.6. Stanovení exprese glykosyltransferáz

Celková RNA byla izolována z 10 mg jaterní tkáně, která byla skladována při  $-80^{\circ}\text{C}$  v konzervačním roztoku (RNAlater tissue storage reagent), pomocí purifikačního kitu na izolaci celkové RNA (Total RNA Purification Kit). Získaná RNA byla převedena do cDNA za využití kitu pro reverzní transkripci (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR) byla provedena pomocí kitu (TaqMan® Gene Expression Assay Kit) pro sialyltransferázu II (*St8Sial1*, Rn00563093\_m1), galaktosyltransferázu II (*B4Galt2*, Rn01417399\_m1) a  $\beta$ -aktin (*Actb*, Rn00667869\_m1), který sloužil jako endogenní kontrola (house-keeping gen). Složení reakční směsi bylo následující: 5  $\mu\text{l}$  cDNA (ředěna 1:4), 6  $\mu\text{l}$  TaqMan master mixu, 0,6  $\mu\text{l}$  směsi primerů a fluorescenčně značené sondy specifické pro jednotlivé geny a 0,4  $\mu\text{l}$  deionizované vody. Experimentální podmínky pro vlastní měření byly: 10 minut při  $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$  pro aktivaci TaqMan enzymu, 15 sekund při  $95\text{--}99^{\circ}\text{C}$  pro denaturaci DNA a 1 minutu při  $60^{\circ}\text{C}$  pro hybridizaci primerů. Získané  $C_T$  hodnoty (cycle threshold) amplifikačních křivek byly využity pro kvantifikaci míry exprese genů pro sialyltransferázu II a galaktosyltransferázu II.

### 3.5.5. Statistická analýza

Normálně distribuovaná data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka a byla analyzována Studentovým T-testem. Nenormálně rozložená data jsou prezentována jako medián (25%–75%) a analyzována Mann-Whitney Rank Sum testem. Kruskal Wallisova ANOVA s post hoc analýzou byla použita pro vícenásobné porovnávání. Výsledky byly vyhodnoceny programem STATISTICA CZ software, v. 10. Rozdíly s hodnotou  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky signifikantní.

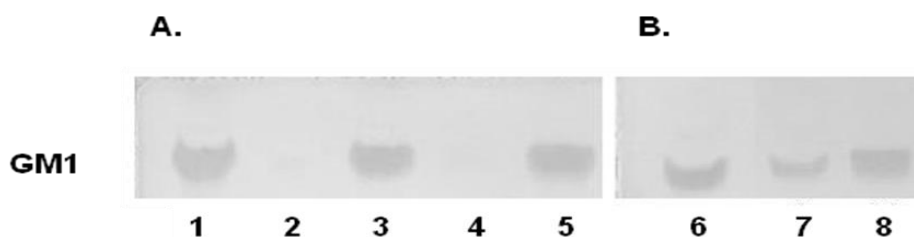
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky choleratoxinu *in situ*

#### 4.1.1. Vliv fixace na extrakci GM1 gangliosidu z jaterních řezů

V úvodních experimentech jsme optimalizovali fixaci jaterních kryostatových řezů acetonem. Zajímalo nás především, jestli může teplota fixace a obsah vodné složky ve fixačním činidle vést ke ztrátám GM1 gangliosidu a tím i ovlivnit následnou detekci B podjednotkou choleratoxinu dle popsané metodiky v kapitole 3.5.1.1. „Kvantifikace ztrát GM1 gangliosidu během acetonové fixace“.

Ztráty GM1 byly studovány po různých fixacích při teplotách -20°C a 25°C. Následně byly řezy re-extrahovány chloroform:methanol:vodou (C:M:V) v poměru 10:10:1. Vliv vodné složky byl testován zvýšením vodného zastoupení v extrakční směsi na 10% vody. Vzorky byly srovnávány s „kontrolní“ extrakcí C:M:V 10:10:1, jež byla považována za 100% extrakci GM1. Výsledky ztrát gangliosidů byly denzitometricky vyhodnoceny po chromatografii na tenké vrstvě (TLC), Obr. 19.



Obr. 19: Extrakce gangliosidu GM1: A) vliv teploty; B) vliv vodné složky acetonu.

A) 1: přímá extrakce GM1 chloroform:methanol:vodou v poměru 10:10:1 (C:M:V)

2: extrakce acetonem při teplotě -20°C

3: re-extrakce C:M:V po předešlé extrakci acetonem při teplotě -20°C



4: extrakce acetonem při teplotě 25°C

5: re-extrakce C:M:V po předešlé extrakci acetonem při teplotě 25°C

B) 6: přímá extrakce GM1 chloroform:methanol:vodou v poměru 10:10:1 (C:M:V)

7: extrakce směsí aceton:voda v poměru 9:1 při teplotě -20°C

8: re-extrakce C:M:V po předešlé extrakci směsí acetonu a vody

Chromatogram dokumentuje, že teplota má na extrakci GM1 do bezvodého acetonu minimální vliv. Procentuální ztráta GM1 byla vypočítána jako rozdíl mezi průměrnou denzitou GM1 přímo v kontrolních extraktech získaných C:M:V (100% extrakce) a průměrnou denzitou získanou re-extrakcí C:M:V po působení acetonu, Obr. 19. Obsah GM1 gangliosidu byl stanoven v re-extraktech po působení acetonu při teplotě -20°C na 98,1% a při 25°C na 96,2%. Ztráta GM1 byla vypočítána na 1,9% pro acetonu při -20°C a 3,8% při 25°C. Na rozdíl od teploty je obsah vody v extrakčním činidle pro ztráty gangliosidů kritický. 10% vodná složka v acetonu při -20°C zvýšila ztrátu GM1 na 30,5%, Tab. 3.

<b>Typ fixace (extrakce)</b>	<b>% ztráty gangliosidů</b>
Chloroform:methanol:voda (C:M:V), 10:10:1	100
Bezvodý aceton při teplotě -20°C	1,9
Bezvodý aceton při 25°C	3,8
90% aceton při teplotě -20°C	30,5

Tab. 3: Extrakce GM1 gangliosidu po různých druzích fixace s následným denzitometrickým vyhodnocením.

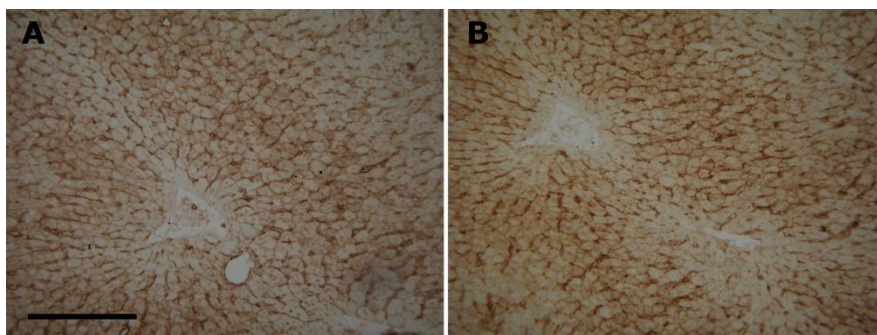
#### **4.1.2. Vliv acetonové fixace na extrakci gangliosidů ze suchých jaterních a mozkových homogenátů**

Vzhledem k tomu, že denzitometrická analýza chromatogramů po extrakci GM1 z jaterních řezů je pouze semikvantitativní, ověřili jsme si získaná data na kvantitativní analýze ztrát celkových gangliosidů z lyofilizovaných jaterních a mozkových homogenátů. Využito bylo fotometrické metody, která byla popsána v kapitole 3.5.1.6. „Fotometrické stanovení celkových gangliosidů“.

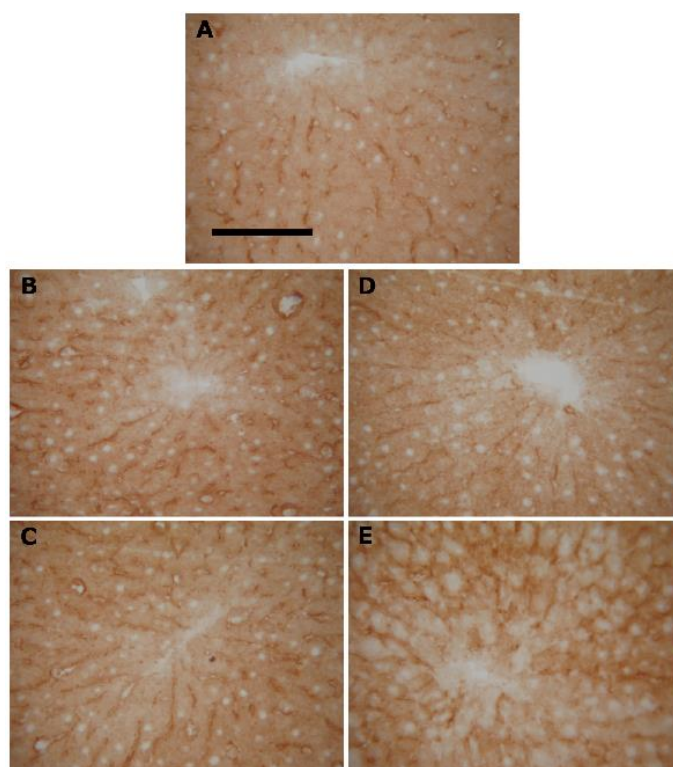
Průměrná hodnota celkových gangliosidů získaná C:M:V (4:8:3) extrakcí z homogenátů byla považována za 100%. Ztráta gangliosidů do acetonu byla u jaterní tkáně  $3,0 \pm 0,3\%$  a u mozkové tkáně  $9,5 \pm 1,1\%$ . C:M:V re-extrakty z jaterní tkáně obsahovaly  $97,0 \pm 0,3\%$  gangliosidů a z mozkové tkáně  $90,5 \pm 0,7\%$  gangliosidů.

#### **4.1.3. Histochemická detekce GM1 gangliosidu na jaterních kryostatových řezech**

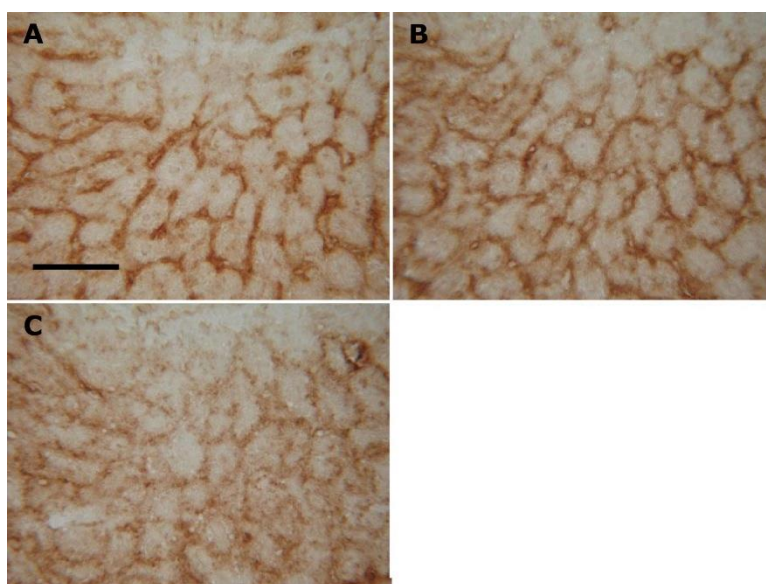
Porovnávány byly dvě nejčastěji užívané fixace kryostatových jaterních řezů, 4% formaldehyd a bezvodý aceton, Obr. 20. Rovněž bylo srovnáváno stanovení GM1 při standardních podmínkách fixace 4% formaldehydem při teplotě  $25^{\circ}\text{C}$  a době 5 minut s fixací bezvodým acetonem při teplotách  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , časech 2 a 15 min a zkoumán byl také vliv vodné složky v acetonu. Časy byly zvoleny s ohledem na naše pilotní data, kde 2 minuty znamenaly přijatelné fixační účinky, a 15 minut reprezentovalo dlouhý fixační interval. Metodou analýzy obrazu bylo zjištěno, že není rozdíl v intenzitě nebo lokalizaci reakčního produktu GM1 u jednotlivých druhů fixace, Obr. 21. Naopak použití směsi aceton:voda v poměru 9:1 vedlo za podmínek 15 minutové fixace při  $-20^{\circ}\text{C}$  k difúzní lokalizaci GM1 na paralelních kryostatových řezech. Zjištěná data nás utvrdila, že vlivem vodné složky dochází ke zvýšené extrakci glykolipidů, Obr. 22.



Obr. 20: Fixace kryostatových řezů jaterní tkáně: A) Bezvodý aceton, 15 minut, -20°C. B) 4% formaldehyd, 5 minut, 25 °C. Řezy s GM1 byly detegovány B podjednotkou choleratoxinu. Měřítko= 200  $\mu$ m.



Obr. 21: Porovnání fixačních časů a teplot u acetonové a 4% formaldehydové fixace jaterní tkáně. A) 4% formaldehyd, 5 min, 25°C; B) aceton, 2 min, -20°C; C) aceton 15 min, -20°C; D) aceton 2 min; 25°C; E) aceton 15 min, 25°C. GM1 gangliosid byl imunohistochemicky barven pomocí B podjednotky choleratoxinu a vizualizován DAB. Měřítko= 100  $\mu$ m.



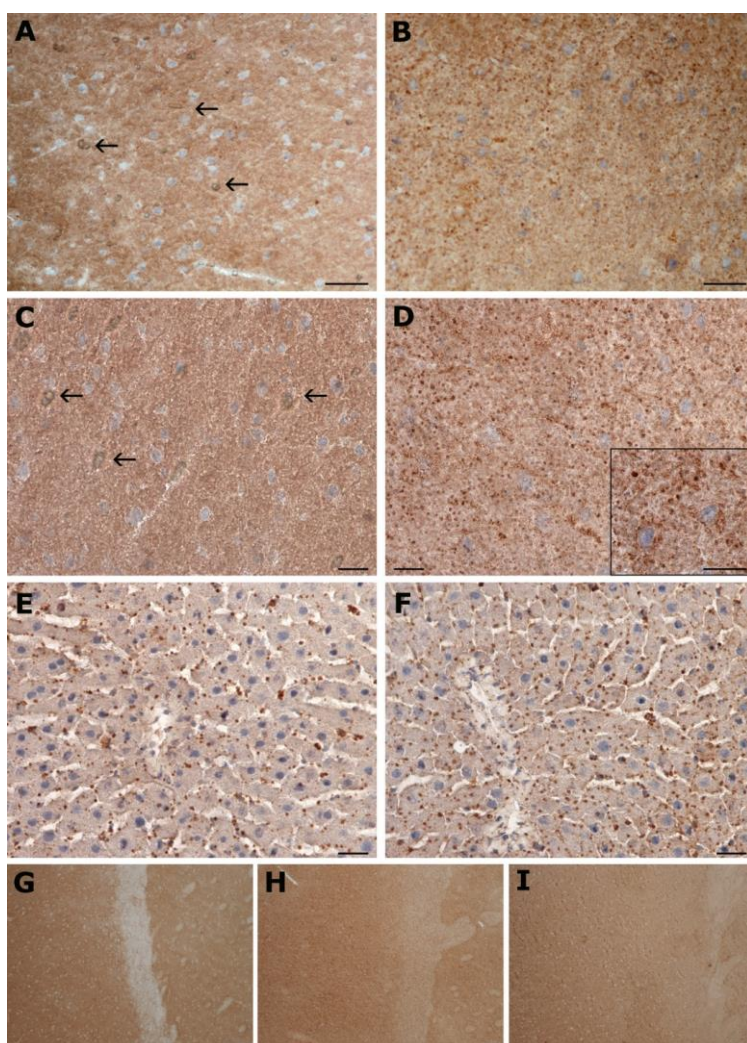
Obr. 22: Vliv vodné složky na extrakci GM1 gangliosidu do acetonu při detekci choleratoxinem. A) 4% formaldehyd, 5 min, 25°C; B) Bezvodý aceton, 15 min, -20°C; C) směs aceton:voda 9:1, 15 min, -20°C. Měřítka= 50  $\mu$ m.

#### 4.1.4. Srovnání detekce GM1 gangliosidu v jaterní a mozkové tkáni po odlišných fixacích

Z dat uvedených výše vyplývá, že u jaterních kryostatových řezů, které byly fixovány 4% formaldehydem a bezvodým acetonem, nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v lokalizaci nebo intenzitě barvení GM1. Kryostatové mozkové řezy, které byly fixovány 4% formaldehydem, dokumentovaly difúzi GM1 v šedé mozkové hmotě, avšak bez ohniskového zvýraznění, Obr. 23 A, C. V bílé mozkové hmotě byla vidět mírná difúzní pozitivita GM1, což je pravděpodobně způsobeno přítomností myelinu. Pokud byl místo 4% formaldehydu (F) užít Bakerův roztok (4% formaldehyd s  $\text{CaCl}_2$ ) vhodný pro fixaci lipidů (B), nebyl v pozitivitě GM1 shledán žádný rozdíl. Při fixaci bezvodým acetonem a následně 4% formaldehydem (A+F) bylo zaznamenáno snížené celkové barvení GM1, avšak barvení bylo více ostré

a odhalovalo přítomnost subcelulárních struktur, Obr. 23 B, D. Užitím bezvodého acetonu a Bakerova roztoku (A+B) došlo ke změně zrnitosti v barvení GM1. Jemná zrnitost GM1 pozorovaná při fixaci acetonem a 4% formaldehydem byla nahrazena hrubou zrnitostí u kombinace acetonu a Bakerova roztoku (data nejsou prezentována).

Vlivem fixace roztokem 4% formaldehydu a methyl- $\beta$ -cyklodextrinu, který má za cíl odstranit membránový cholesterol, docházelo ke snížení barvení GM1 oproti samotnému formaldehydu (Obr. 23 G, H), avšak ke zvýšení obrazové ostrosti GM1 (Obr. 23 H, I). V jaterní tkáni byla zřetelná jemná zrnitost GM1 v membránách na sinusoidálním i kanalikulárním pólu hepatocytu a nebyly zaznamenány změny mezi fixací 4% formaldehydem a bezvodým acetonem, Obr. 23 E, F.



Obr. 23: Srovnání fixačních roztoků při detekci GM1 v jaterní a mozkové tkáni.

A, C) Difúzní pozitivita GM1 po fixaci 4% formaldehydem. Šipky naznačují rovněž pohyby nebarevných myelinových lipidů.

B) Ohniskové zvýraznění GM1 po fixaci bezvodým acetonem a následně 4% formaldehydem.

D) Membránová zrnitost GM1 po fixaci acetonem a následně 4% formaldehydem. Lokalizace GM1 v buněčných membránách je ilustrována v detailu obrázku.

E) GM1 pozitivita v jaterní tkáni po fixaci 4% formaldehydem.

F) GM1 pozitivita v jaterní tkáni po fixaci bezvodým acetonem a následně 4% formaldehydem. Jak ilustrují obrázky E a F, není jemná zrnitost GM1 na buněčných membránách hepatocytu ovlivněna typem fixace.

G) Fixace mozkové tkáně 4% formaldehydem.

H) Vliv methyl- $\beta$ -cyklodextrinu a následně 4% formaldehydu na mozkovou tkáň.

I) Působení bezvodého acetonu a 4% formaldehydu na mozkové řezy.

Obrázky A, B, C, D, G, H a I dokumentují GM1 gangliosid v mozkové tkáni a obrázky E a F v jaterní tkáni. Měřítka u obrázků A a B jsou 50  $\mu\text{m}$ , u obrázků C, D, E a F jsou 25  $\mu\text{m}$  a u obrázků G, H a I jsou 100  $\mu\text{m}$ . Jádra u obrázků A až F byla barvena hematoxylinem.

## **4.2. Vlivu modulace aktivity HMOX na obsah a složení GSL v jaterní tkáni při cholestáze indukované estrogény**

### **4.2.1. Stanovení markerů jaterního poškození**

Nejprve bylo nutné ověřit, zda se nám podařilo subkutánní aplikací ethinylestradiolu navodit cholestázu. Analýzou séra experimentálních zvířat jsme zjistili, že aplikace estrogenu vedla ve srovnání s kontrolami k významnému zvýšení sérového celkového bilirubinu ( $3,2 \pm 2,0$  vs.  $1,0 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P = 0,011$ ), celkových žlučových kyselin ( $115,2 \pm 71,3$  vs.  $5,5 \pm 5,3$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P = 0,020$ ) a aktivity alkalické fosfatázy ( $3,2 \pm 0,9$  vs.  $1,8 \pm 0,4$   $\mu\text{kat/l}$ ,  $P = 0,031$ ), Tab. 4.



	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>aE</b>	<b>iE</b>
<b>Celkový bilirubin [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	1,0 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 2,0*	5,4 $\pm$ 3,7	3,5 $\pm$ 2,1
<b>Žlučové kyseliny [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	5,5 $\pm$ 5,3	115,2 $\pm$ 71,3*	135,6 $\pm$ 84,6	134,7 $\pm$ 72,9
<b>Alkalická fosfatáza [<math>\mu\text{kat/l}</math>]</b>	1,8 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,9*	3,1 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,3

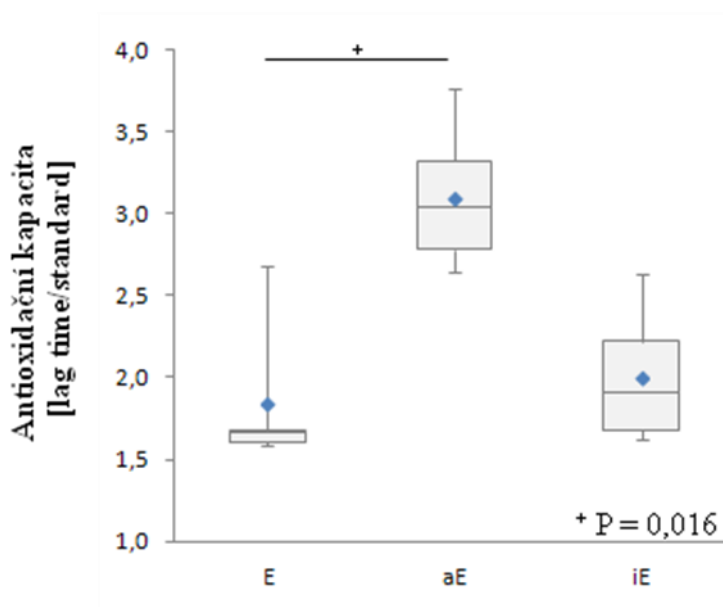
Tab. 4: Markery cholestázy u experimentálních zvířat. Podávání estrogenů vedlo k významnému zvýšení celkového bilirubinu, žlučových kyselin a alkalické fosfatázy, \* $P < 0,05$  vs. C. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty $\pm$ SD. C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.

#### 4.2.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra

Následně bylo nutné zjistit, zda byla modulace HMOX úspěšně navozena. Měření aktivity HMOX plynovou chromatografií dokázalo, že účinkem hemu (induktor HMOX) stoupla aktivita HMOX v játrech téměř na dvojnásobnou hodnotu, zatímco účinkem mesoporfyrinu cínu (inhibitor HMOX) se téměř šestkrát snížila ( $P < 0,05$ ), Tab. 5. Měření celkové antioxidační kapacity séra potvrdilo předpokládané antioxidační účinky indukce HMOX. Antioxidační kapacita séra byla oproti cholestatickým vzorkům zvýšena o 68% ( $P = 0,016$ ), Obr. 24 a Tab. 5. Efekt inhibice HMOX na antioxidační kapacitu pozorován nebyl, Obr. 24 a Tab. 5.

	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>aE</b>	<b>iE</b>
<b>Aktivita HMOX</b> [pmol CO/h/mg FW]	240,8±30,2	261,2±129,1	434,9±143,7 <sup>+</sup>	44,8±11,8 <sup>+</sup>
<b>Antioxidační kapacita séra [%]</b>	241,2±44,5	100±22,7*	168±21,7 <sup>+</sup>	109±20,3

Tab. 5: Změna aktivity HMOX a celkové antioxidační kapacity séra v odpovědi na modulaci HMOX a podávání estrogenů. Modulaci HMOX byly pozorovány významné změny v její aktivitě. Účinkem indukce HMOX bylo rovněž shledáno oproti cholestatické kontrole zvýšení celkové antioxidační kapacity séra, \*P< 0,05 vs. C; <sup>+</sup>P< 0,05 vs. E. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty±SD. C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX. FW– váha nativní jaterní tkáně.



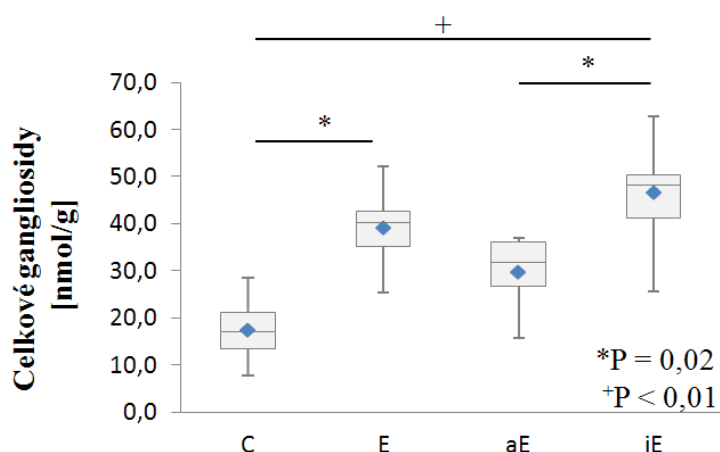
Obr. 24: Efekt modulace HMOX na celkovou antioxidační kapacitu séra cholestatických zvířat. Aktivace HMOX zvyšuje antioxidační aktivitu o 68%, inhibicí nebyl pozorován žádný



významný efekt. E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.

#### 4.2.3. Analýza jaterních gangliosidů

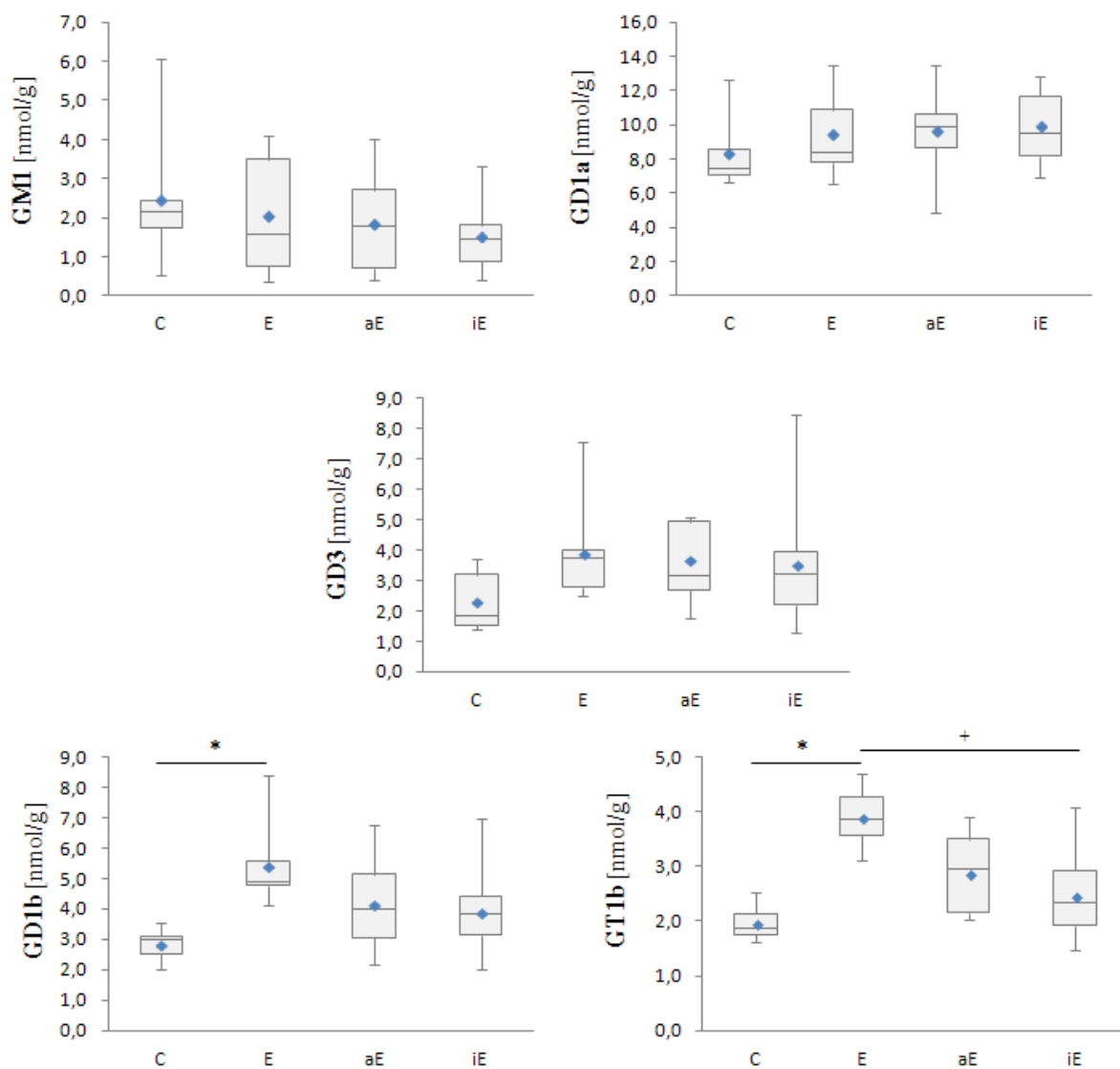
Obsah celkových gangliosidů v játrech byl významně zvýšen u cholestatických vzorků (E) a vzorků s inhibovanou HMOX (iE) oproti kontrolám (C): [C 17,0 (8,9–26,5); E 40,3 (27,4–49,9) a iE 48,1 (33,0–60,3) nmol/g;  $P < 0,05$ ], zatímco indukce HMOX nevedla k signifikantním změnám,  $P = 0,274$ , Obr. 25.



Obr. 25: Účinek cholestázy indukované estrogény a modulace HMOX na obsah celkových gangliosidů v jaterní tkáni, \* $P = 0,02$ ; + $P < 0,01$ . C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.

V další části studie bylo rovněž analyzováno zastoupení jednotlivých jaterních gangliosidů. Změny v koncentraci gangliosidů GM1, GD1a (biosyntetická a– větev) a GD3 (počátek biosyntetické b– větve) nebyly vlivem estrogenů, ani modulace HMOX pozorovány. Naproti

tomu gangliosidy GD1b a GT1b (terminální část biosyntetické b- větve) byly vlivem estrogenů zvýšeny. Inhibice HMOX u cholestatických zvířat vedla ke snížení v zastoupení GT1b gangliosidu, Obr. 26.



Obr. 26: Kvantifikace změn ve složení jaterních gangliosidů při cholestáze vyvolané estrogeny a modulaci HMOX. Z uvedených dat vyplývá, že navozením cholestázy ani modulací HMOX nedochází u gangliosidů GM1, GD1a a GD3 ke změnám. K těm dochází až u GD1b a GT1b gangliosidů, které reprezentují koncovou část biosyntetické b- větve. Vlivem estrogenů dochází u obou gangliosidů k významnému zmnožení. U GT1b gangliosidu byl

navíc pozorován vlivem inhibice HMOX pokles v jeho zastoupení. \* $P < 0,005$  vs. C;  $^+P = 0,01$  vs. E. E– zvířata po aplikaci ethinylestradiolu; aE– zvířata po aplikaci ethinylestradiolu a aktivaci HMOX; iE– zvířata po aplikaci ethinylestradiolu s inhibovanou HMOX.

#### 4.2.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz

Ke stanovení míry aktivace jednotlivých biosyntetických větví gangliosidů byly v jaterních homogenátech studovány relativní exprese galaktosyltransferázy II (nespecifická GM1 syntázy) a sialyltransferázy II (specifická GD3 syntáza). V porovnání s kontrolními vzorky nedošlo vlivem cholestázy ani modulace HMOX v expresi GalT II k rozdílům (C:  $100 \pm 36\%$ ; E:  $98 \pm 27\%$ , aE:  $113 \pm 43\%$  a iE:  $89 \pm 23\%$ ). Exprese SAT II, dokumentující biosyntézu gangliosidů b– větve, byla vlivem aplikace estrogenů zvýšena (C:  $100 \pm 56\%$ ; E:  $230 \pm 77\%$ ,  $P = 0,04$ ), avšak účinkem podaného hemu pozorované zvýšení mizí (E:  $230 \pm 77\%$ ; aE:  $186 \pm 84\%$ ,  $P > 0,05$ ). Současné podání estrogenů a mesoporfyrinu cínu inhibující HMOX způsobilo naopak oproti cholestatickým vzorkům snížení exprese SAT II (E:  $230 \pm 77\%$ ; iE:  $60 \pm 48\%$ ,  $P = 0,008$ ), Tab. 6.

Skupina	Relativní exprese SAT II [%]	Relativní exprese GalT II [%]
<b>C</b>	$100 \pm 56$	$100 \pm 36$
<b>E</b>	$230 \pm 77^*$	$98 \pm 27$
<b>aE</b>	$186 \pm 84$	$113 \pm 43$
<b>iE</b>	$60 \pm 48^+$	$89 \pm 23$

Tab. 6: Relativní exprese sialyltransferázy II a galaktosyltransferázy II po modulaci HMOX a aplikaci estrogenů. Data jsou prezentována jako % kontrol (C). C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou

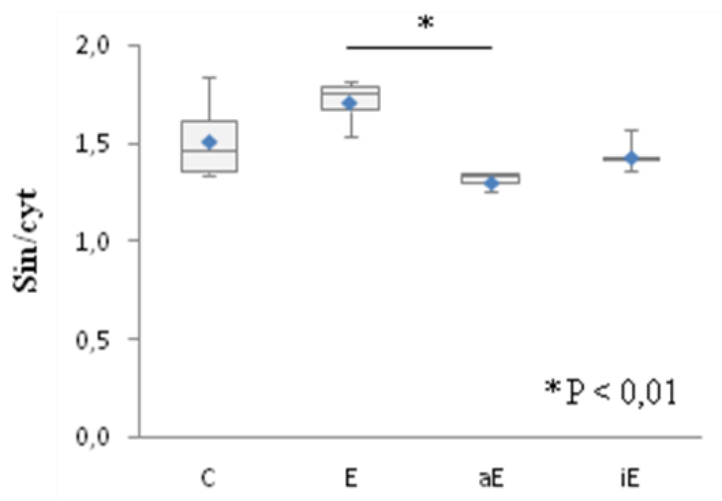
HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX. \*P= 0,04 vs. C; <sup>†</sup>P= 0,008 vs. E

#### 4.2.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni

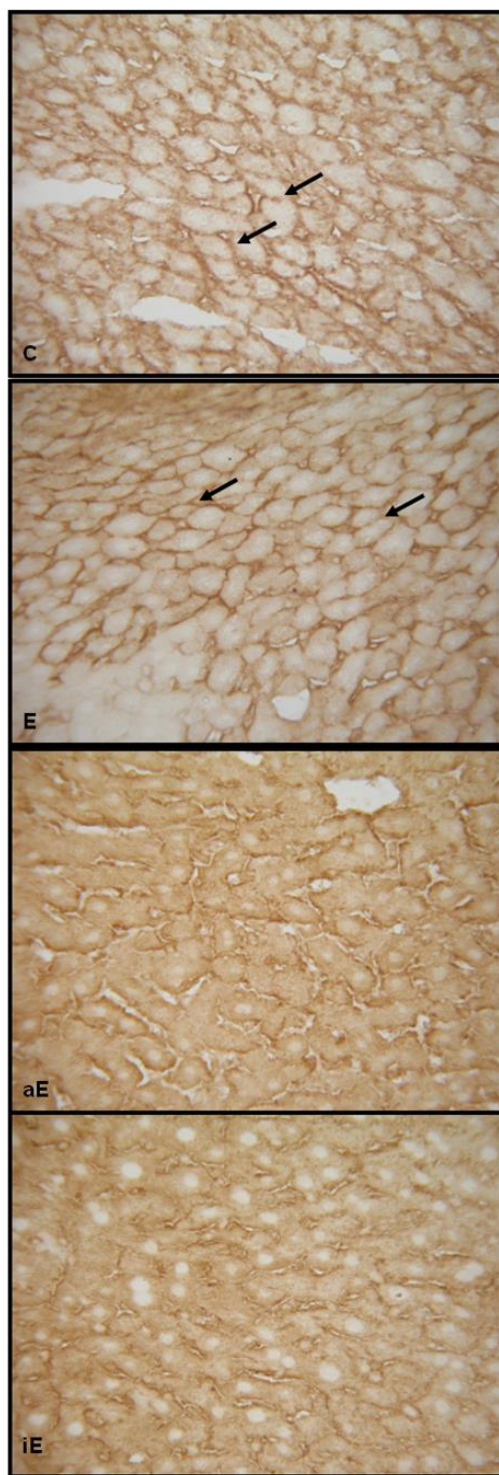
Z histochemické analýzy kryostatových řezů bylo zjištěno, že cholestáza i aktivace HMOX má vliv na distribuci GM1 gangliosidu v jaterní buňce. Ve srovnání s kontrolním materiálem byl u cholestatických vzorků pozorován přesun GM1 z cytoplasmy do sinusoidální membrány. Modulací HMOX dochází postupně k eliminaci GM1 pozitivitu v sinusoidálních membránách a gangliosid se přemísťuje zpět do subsinusoidální oblasti cytoplasmy, Tab. 7 a Obr. 27 a 28.

Skupina	GM1 v sinusoidálních membránách a cytoplasmě = sin/cyt
<b>C</b>	1,51±0,19
<b>E</b>	1,71±0,10
<b>aE</b>	1,31±0,04*
<b>iE</b>	1,43±0,06

Tab. 7: Změny v distribuci GM1 gangliosidu v hepatocytech po aplikaci estrogenů a modulaci HMOX. Vlivem estrogenů dochází k přesunu GM1 z cytoplasmy (cyt) do sinusoidálních membrán (sin). Následným podáním hemu či mesoporfyrinu cínu byla pozorována eliminace ze sinusoid a přesun GM1 zpět do cytoplasmy, \*P< 0,01 vs. E. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty±SD. C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.



Obr. 27: Účinek modulace HMOX na redistribuci GM1 gangliosidu v hepatocyty. GM1 gangliosid byl měřen v sinusoidálních membránách (sin) a oblasti cytoplasmy (cyt) hepatocyty. Data jsou prezentována jako poměr sin/cyt. Cholestáza indukovaná estrogeny vede k přesunu GM1 gangliosidu do sinusoidální membrány, zatímco vlivem aktivace HMOX dochází k přesunu GM1 pozitivitu ze sinusoid zpět do subsinusoidálního prostoru cytoplasmy, \* $P < 0,01$ . C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.



Obr. 28: Vliv modulace HMOX na lokalizaci GM1gangliosidu při cholestáze. GM1 byl na jaterních řezech detegován užitím B podjednotky choleratoxinu a vizualizován DAB. U kontrolních řezů (C) byla GM1 pozitivita shledána jak v sinusoidálních, tak i kanalikulárních membránách (dokumentováno šipkami). U cholestatických řezů byl zjištěn přesun GM1

z cytoplasmy do sinusoidální oblasti (ilustrováno šipkami). Účinkem modulace HMOX bylo pozorováno vymizení GM1 pozitivitu ze sinusoidálních membrán a jeho návrat zpět do subsinusoidálního prostoru hepatocytu. Měřítka= 100  $\mu$ m. C– kontrolní skupina; E– skupina s aplikací ethinylestradiolu; aE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a aktivovanou HMOX; iE– skupina s aplikací ethinylestradiolu a inhibovanou HMOX.

### 4.3. Změny ve složení a distribuci glykolipidů u obstrukční cholestázy

#### 4.3.1. Stanovení markerů jaterního poškození

Analýzou sérových markerů cholestázy jsme zhodnotili, zda se nám podvazem segmentálních žlučových cest podařilo navodit cholestatické jaterní poškození, Tab. 8. Pozorováno bylo významné zvýšení sérového celkového bilirubinu, celkových žlučových kyselin a aktivity alkalické fosfatázy.

	<b>SO</b>	<b>BDL</b>
<b>Celkový bilirubin [<math>\mu</math>mol/l]</b>	1,4 $\pm$ 0,6	320,5 $\pm$ 74,0*
<b>Žlučové kyseliny [<math>\mu</math>mol/l]</b>	17,3 $\pm$ 9,2	372,0 $\pm$ 132,3*
<b>Alkalická fosfatáza [<math>\mu</math>kat/l]</b>	2,0 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,3*

Tab. 8: Vliv podvazu žlučových cest na stupeň cholestázy. Podvaz segmentálních žlučových cest oproti kontrolní skupině s laparotomií způsobil významné změny v celkovém bilirubinu, celkových žlučových kyselinách a alkalické fosfatáze, \*P< 0,05 vs. SO. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty $\pm$ SD. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových cest.

#### 4.3.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra

Dále jsme zjišťovali, jestli má podvaz segmentálních žlučvodů vliv na změny v aktivitě HMOX a zda je ovlivněna tímto zásahem také celková antioxidační kapacita séra. Získané výsledky nám ukázaly, že podvaz žlučvodů významně snižuje aktivitu HMOX a naopak signifikantně zvyšuje antioxidační kapacitu séra, Tab. 9.

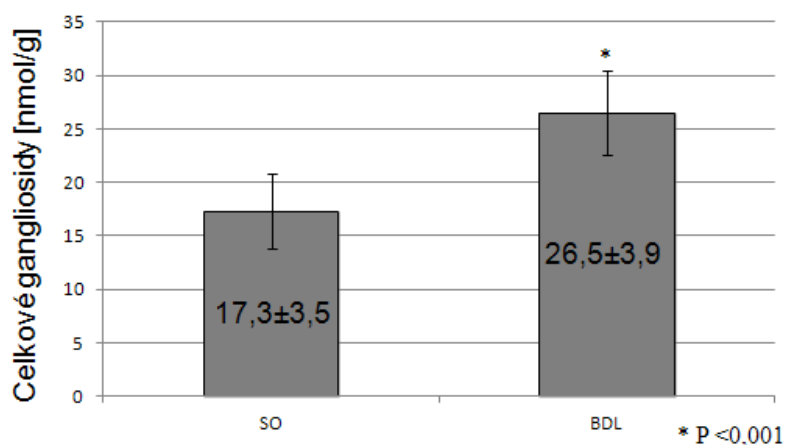
	SO	BDL
<b>Aktivita HMOX</b> <b>[pmol CO/h/mg FW]</b>	327,7±48	199,4±36*
<b>Antioxidační kapacita séra [%]</b>	100±30	210±13*

Tab. 9: Vliv podvazu segmentálních žlučvodů na změny v aktivitě HMOX a celkové antioxidační kapacitě séra. U obstrukční cholestázy je pozorováno významné snížení aktivity HMOX a naopak zvýšení v antioxidační kapacitě séra, \*P< 0,05 vs. SO. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty±SD. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů.

#### 4.3.3. Analýza jaterních gangliosidů

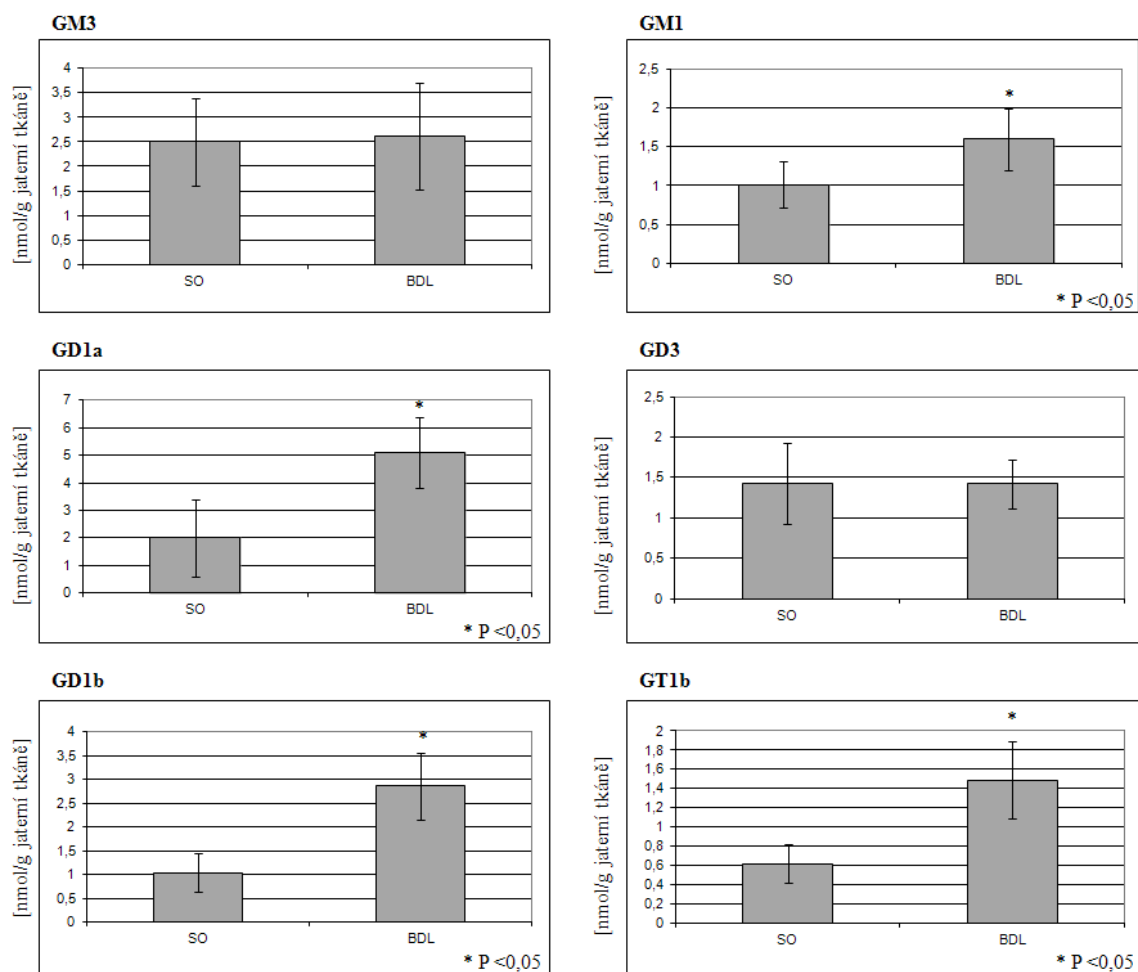
Koncentrace celkových gangliosidů byla fotometricky stanovena jako celkový obsah lipidní kyseliny sialové. U skupiny zvířat s obstrukční cholestázou (BDL) bylo pozorováno významné zvýšení celkových gangliosidů ve srovnání s odpovídajícími kontrolami (SO), Obr. 29.





Obr. 29: Efekt obstrukční cholestázy na celkový obsah gangliosidů v játrech. Podvaz segmentálních žlučovodů způsobí u zvířat významný nárůst v obsahu celkových jaterních gangliosidů, \*P< 0,001. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s obstrukční cholestázou.

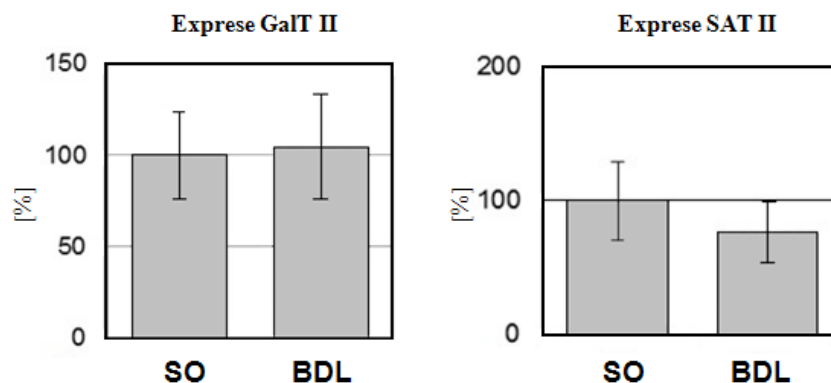
V rámci experimentů byl studován rovněž vliv obstrukční cholestázy na spektrum izolovaných jaterních gangliosidů s využitím resorcinolové detekce a následné denzitometrické analýzy. Vlivem obstrukční cholestázy (BDL) dochází k významnému zmnožení gangliosidů GM1, GD1a, GD1b a GT1b, P< 0,05 v játrech, zatímco obsah gangliosidů GM3 a GD3 se nemění, Obr. 30.



Obr. 30: Účinek obstrukční cholestázy na spektrum jaterních gangliosidů. Vlivem cholestázy indukované podvazem bylo pozorováno významné zvýšení gangliosidů u terminálních částí biosyntetických větví a– (GM1 a GD1a) i b– (GD1b a GT1b), \*P< 0,05. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučovýchodů.

#### 4.3.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz

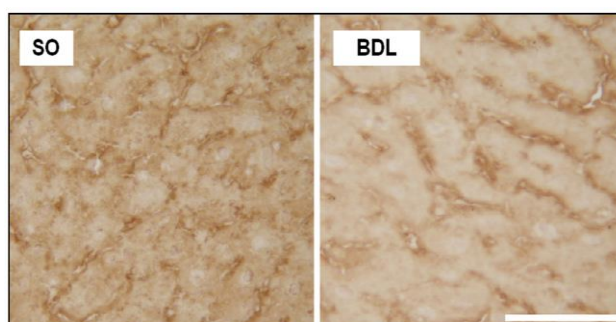
Abychom zjistili, zda pozorované změny ve spektru gangliosidů jsou podmíněny regulací klíčových enzymů syntézy glykolipidů, stanovili jsme relativní expresi mRNA pro galaktosyltransferázu II (GalT II) a sialyltransferázu II (SAT II). Ze získaných dat vyplývá, že ani u jednoho z enzymů nedochází k významným změnám vlivem obstrukční cholestázy, Obr.



Tab. 31: Efekt obstrukční cholestázy na expresi mRNA klíčových enzymů syntézy jaterních gangliosidů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontrol (SO). SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s obstrukční cholestázou.

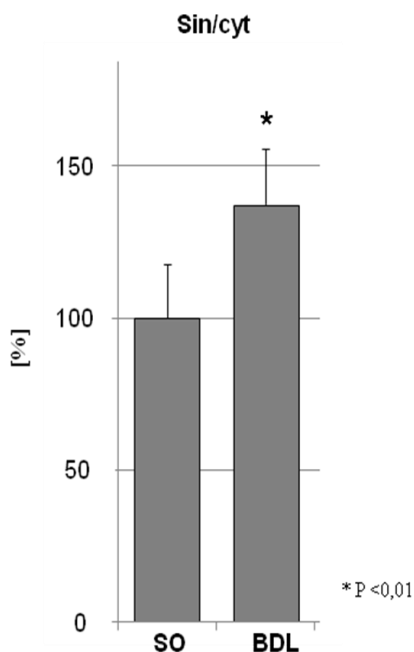
#### 4.3.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni

Histochemickou analýzou kryostatových jaterních řezů využívající B podjednotku choleratoxinu a vizualizaci tetrahydrochloridem diaminobenzidinu bylo pozorováno, že vlivem obstrukční cholestázy (BDL) dochází oproti kontrolním vzorkům (SO) k přesunu gangliosidu GM1 z cytoplasmy do sinusoidální membrány hepatocytu (zvýšení poměru sin/cyt), Obr. 32 a 33.



Obr. 32: Lokalizace GM1 v kontrolních a cholestatických jaterních vzorcích. Vlivem obstrukční cholestázy dochází k významnému přesunu GM1 z cytoplasmy do sinusoidálních

membrán hepatocytu. Měřítka= 50  $\mu$ m. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s obstrukční cholestázou.



Obr. 33: Vliv obstrukční cholestázy na přesun GM1 gangliosidu. Výše uvedenou analýzou obrazu bylo zjištěno, že účinkem obstrukční cholestázy dochází k významnému přesunu GM1 z oblasti cytoplasmy (cyt) do sinusoidálních membrán (sin) hepatocytu. \*P< 0,01. SO– kontrolní skupina po laparotomii; BDL– skupina s obstrukční cholestázou.

#### 4.4. Vliv modulace HMOX na obstrukční cholestázu

##### 4.4.1. Vliv modulace HMOX na markery jaterního poškození

V této části studie jsme zhodnotili vliv modulace HMOX hemem (aktivace) a mesoporfyrinem cínu (inhibice) na stupeň cholestatického poškození jater, Tab. 10. V obou případech bylo pozorováno významné zvýšení sérových hladin celkových žlučových kyselin a při aktivaci HMOX navíc snížení aktivity alkalické fosfatázy. Změny v koncentracích celkového bilirubinu v séru nebyly pozorovány.

	<b>BDL</b>	<b>aBDL</b>	<b>iBDL</b>
<b>Celkový bilirubin [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	320,5 $\pm$ 74,0	291,0 $\pm$ 38,1	215,4 $\pm$ 47,0
<b>Žlučové kyseliny [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	372,0 $\pm$ 132,3	638,4 $\pm$ 188,2*	612,6 $\pm$ 164,1*
<b>Alkalická fosfatáza [<math>\mu\text{kat/l}</math>]</b>	4,4 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,5*	3,5 $\pm$ 0,9

Tab. 10: Vliv modulace HMOX na stupeň cholestatického jaterního poškození. \*P< 0,05 vs. BDL. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatná odchylka. BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučodů; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučodů a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučodů a inhibovanou HMOX.

#### 4.4.2. Stanovení aktivity HMOX a antioxidační kapacity séra

V rámci tohoto experimentu jsme ověřili, že byla modulace HMOX úspěšně provedena. Podle očekávání vedla aplikace hemu k signifikantnímu zvýšení aktivity HMOX, zatímco meosporfyrin cín HMOX aktivitu významně snižoval. Měřením celkové antioxidační kapacity séra bylo zjištěno, že jak aktivace, tak inhibice HMOX vede k významnému zvýšení antioxidační kapacity séra ve srovnání s kontrolní skupinou (BDL), Tab. 11.

	<b>BDL</b>	<b>aBDL</b>	<b>iBDL</b>
<b>HMOX [<math>\mu\text{mol CO/h/mg FW}</math>]</b>	199,4 $\pm$ 36,5	640,6 $\pm$ 122,9*	59,3 $\pm$ 7,0*
<b>Antioxidační kapacita séra [%]</b>	100,0 $\pm$ 7,8	139,7 $\pm$ 28,0*	165,2 $\pm$ 37,3*

Tab. 11: Vliv modulace HMOX na celkovou antioxidační kapacitu séra. \*P< 0,05 vs. BDL. Data vyjadřující aktivitu HMOX jsou prezentována jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatná odchylka a data vypovídající o antioxidační kapacitě jsou vyjádřena jako procenta

z kontrolních hodnot (BDL). BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů a inhibovanou HMOX.

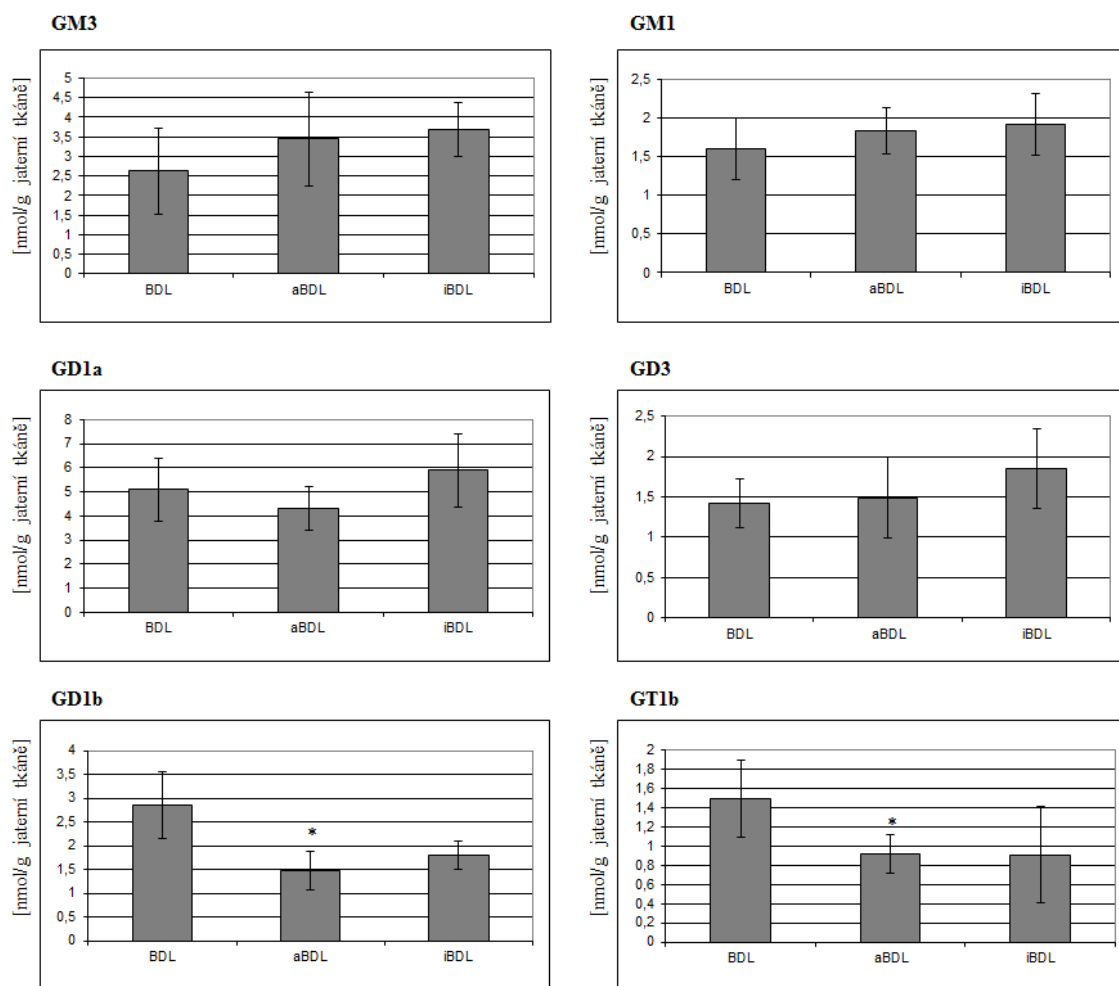
#### 4.4.3. Analýza jaterních gangliosidů

Obsah gangliosidů byl stanoven fotometricky a bylo pozorováno, že vlivem modulace HMOX dochází v jaterní cholestatické tkáni k významnému zvýšení koncentrace celkových gangliosidů, Tab. 12.

	<b>BDL</b>	<b>aBDL</b>	<b>iBDL</b>
<b>Celkové gangliosidy [nmol/g]</b>	26,5±3,9	52,1±9,02*	51,6±6,2*

Tab. 12: Vliv modulace HMOX na celkový obsah jaterních gangliosidů. \*P< 0,05 vs. BDL. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka. BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučvodů a inhibovanou HMOX.

Podrobná analýza jaterních gangliosidů byla u jednotlivých skupin provedena tenkovrstevnou chromatografií s následným denzitometrickým vyhodnocením. Z výsledků vyplynulo, že k významným změnám ve studovaném spektru gangliosidů dochází při indukci HMOX. Konkrétně se jedná o snížení koncentrace gangliosidů GD1b a GT1b reprezentující terminální část biosyntetické b- větve gangliosidů, Obr. 34.



Obr. 34: Vliv modulace HMOX při obstrukční cholestáze na spektrum jaterních gangliosidů.

\* $P < 0,05$  vs. BDL. BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučovodů; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučovodů a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučovodů a inhibovanou HMOX.

#### 4.4.4. Stanovení exprese glykosyltransferáz

Pro studium změn ve spektru gangliosidů jsme rovněž měřili relativní expresi mRNA klíčových enzymů biosyntetické dráhy gangliosidů galaktosyltransferázy II (GalT II) a sialyltransferázy II (SAT II). Ze získaných dat vyplývá, že inhibice HMOX významně zvyšuje expresi SATII a naopak aktivace HMOX snižuje expresi GalTII, Tab. 13.

Skupina	Relativní exprese SAT II [%]	Relativní exprese GalT II [%]
<b>BDL</b>	100±29,4	100±26,8
<b>aBDL</b>	95,6±25,7	64,3±10*
<b>iBDL</b>	242,6±58,8*	142,9±23,2

Tab. 13: Efekt modulace HMOX na expresi mRNA klíčových enzymů, biosyntetické dráhy jaterních gangliosidů. Hodnoty jsou prezentovány jako procenta kontrolních hodnot (BDL).

\*P< 0,05 vs. BDL. BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových a inhibovanou HMOX.

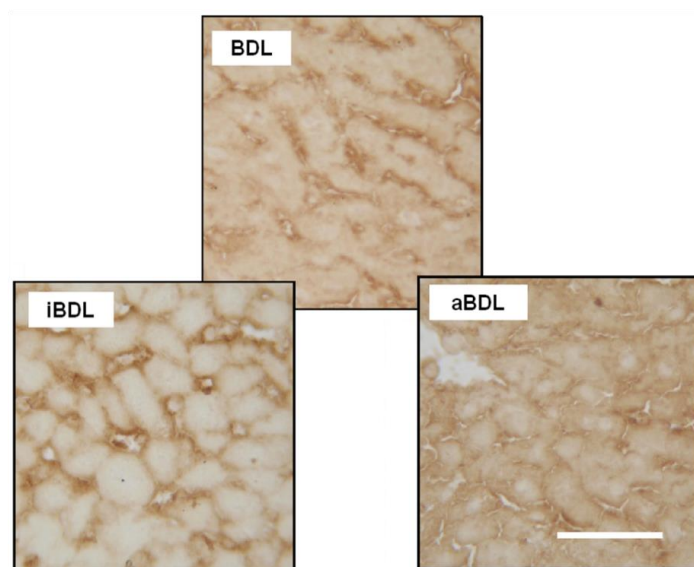
#### 4.4.5. Histochemická detekce GM1 gangliosidu v jaterní tkáni

Histochemickou analýzou jaterních řezů bylo zjištěno, že indukci HMOX dochází ve srovnání s kontrolními vzorky s obstrukční cholestázou ke zvýšené akumulaci GM1 gangliosidu v subsinusoidální oblasti cytoplasmy. Naproti tomu inhibice HMOX způsobí významný přesun GM1 do sinusoidálních membrán hepatocytu, Obr. 35A.

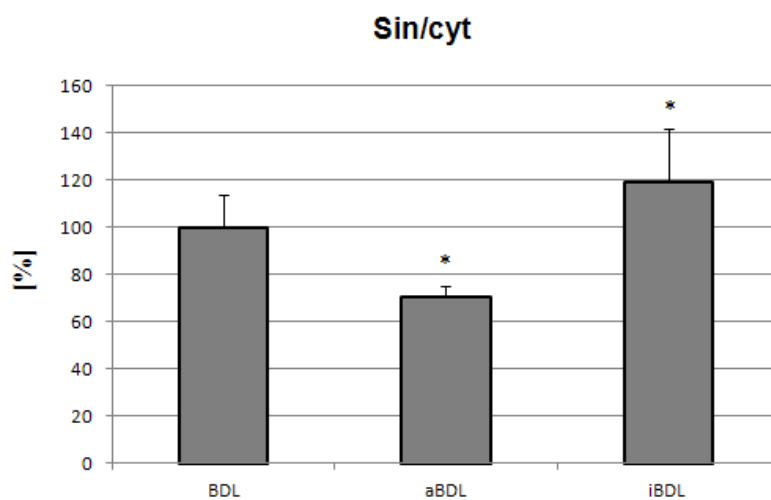
Změny v lokalizaci GM1 byly kvantifikovány analýzou obrazu a hodnoty optické denzity v sinusoidální a cytoplasmatické oblasti hepatocytu byly dány do poměru (sin/cyt) (Obr. 35).



A.



B.



Obr. 35: Lokalizace gangliosidu GM1 v jaterní tkáni při modulaci HMOX a obstrukční cholestáze.

A - účinkem inhibice HMOX byl pozorován u cholestatických vzorků významný přesun GM1 z cytoplasmy do sinusoidální oblasti hepatocytu. Aktivace HMOX naopak způsobí výraznou detekci GM1 v oblasti cytoplasmy. Gangliosid GM1 byl detegován B podjednotkou choleratoxinu a vizualizován pomocí DAB. Měřítka= 50  $\mu$ m.

B – Aplikace hemu způsobila zvýšenou detekci GM1 zejména v cytoplasmatické oblasti (cyt). Naproti tomu mesoporfyrin cínu způsobil zvýšený přesun GM1 zejména do sinusoidálních membrán hepatocytu (sin), \*P< 0,05 vs. BDL. Data jsou vyjádřena jako procenta z kontrolních hodnot (BDL).

BDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových; aBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových a aktivovanou HMOX; iBDL– skupina s podvazem segmentálních žlučových a inhibovanou HMOX.

## 5. DISKUZE

Glykosfingolipidy jsou ze všech tkání lidského organismu nejvíce zastoupeny v centrálním nervovém systému. Zde jsou v každé buňce a zejména pak neuronech, kde tvoří přibližně 10% membránových lipidů, a v synaptických membránách (Hansson et al. 1977). V 1 g vlhké šedé mozkové hmoty je obsaženo přibližně 880  $\mu\text{g}$  a v bílé mozkové hmotě 275  $\mu\text{g}$  lipidně vázané kyseliny sialové. Jaterní tkáň obsahuje GSL o poznání méně, pouze 66  $\mu\text{g}$ , avšak z našeho pohledu se jedná o klíčovou tkáň. Hlavní úloha GSL v organismu tkví v tom, že svoji oligosacharidovou částí vytváří na povrchu receptorová místa pro extracelulární agens (Hakomori et al. 1983). Majoritně jsou GSL zapojeny do složitých metabolických kaskád v rámci buněčné signalizace, což z nich činí potenciální terapeutický cíl pro farmakologický průmysl. Již několik let se ví, že spektrum nervových gangliosidů se mění během vývoje a v závislosti na diferenciaci nervového systému (Rahmann 1985). Nás v tomto kontextu zajímalo, zda jsou změny ve spektru a lokalizaci gangliosidů pozorované také v jaterní tkáni při cholestatickém onemocnění a zda tyto změny mohou mít hepatoprotektivní charakter.

V současné době se zvyšuje zájem o studium glykosfingolipidů či glykolipidových membránových mikrodomén na buněčné a subcelulární úrovni. K tomuto účelu se stále častěji využívají mikroskopické metody, protože techniky založené na účincích detergentů a následné ultracentrifugaci mění celistvost buňky či jejích kompartmentů. Při průkazu gangliosidů bývá často používána acetonová fixace histologických řezů, neboť tato metoda nejlépe zachovává morfologii tkání (Kotani et al. 1993; Kusunoki et al. 1993; Furuya et al. 1994; Furuya et al. 1995). Některé práce poukazují na to, že i přesto, že jsou glykolipidy v acetonu velmi málo rozpustné, měla by být interpretace jejich histologické detekce opatrná, protože i minimální extrakce GSL do acetonu může mít za následek značnou imunodifuzi (Chark et al. 2004).

Podle prací jiných autorů (Schwarz et al. 1996; Schwarz et al. 1997) však může docházet k nežádoucí extrakci GSL do acetonového fixačního média. V těchto studiích byly neurony fixovány roztoky s různým složením a autoři uzavírají, že vlivem acetonu dochází k redukci GSL až o 56%. Pokud byl užit nejprve formaldehyd a teprve poté aceton, vedla tato kombinace k redukci GSL o 46% a při použití samotného formaldehydu dokonce pouze o 10%. S výše popsanými závěry jsou však v rozporu jejich vlastní imunohistochemická pozorování, kde byla nejvýraznější detekce gangliosidů po užití kombinace formaldehydu a následně acetonu.

S ohledem na značné kontroverze v publikovaných pracích jsme se nejprve ve studii „*Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu užitím B podjednotky choleratoxinu in situ*“ zaměřili na nalezení optimálního fixačního roztoku pro GSL. Za různých podmínek (rozdílné teploty fixativ a vliv vodné složky) jsme studovali účinky fixace formaldehydem a acetonem na kryostatových řezech a extraktech z tkáňových homogenátů. Zjistili jsme, že k významným rozdílům po fixaci jaterních řezů formaldehydem a bezvodým acetonem nedochází. Tuto skutečnost nám potvrdila i data získaná studiem extrakce GSL z tkáňových homogenátů. Při analýze účinků acetonu na mozkovou tkáň, obsahující více myelinových lipidů, byla pozorována vyšší extrakce gangliosidů ( $9,5 \pm 1,1\%$ ), což bylo v mozkových kryostatových řezech v souladu s pozorovanou nižší intenzitou detekce GM1. Vliv teploty acetonu na ztráty GSL se jevil jako zanedbatelný faktor, avšak efekt vodné složky je dle našeho pozorování klíčovou záležitostí. Již 10% zastoupení vody ve fixačním roztoku má za následek významnou a nežádoucí extrakci GSL ( $30,5 \pm 4,8\%$ ). Tato skutečnost může vysvětlovat odlišné závěry Schwarze a Futermana (Schwarz et al. 1997), kteří popsali přibližně poloviční redukci GSL v neuronech po acetonové fixaci. Neuronální buňky se vyznačují vysokým nitrobuněčným obsahem vody a tak výrazně zvyšují procento vodné složky v použitém acetonovém roztoku.

V naší práci jsme zjistili, že při fixaci GSL acetonem v histologických řezech je klíčové zachování minimálního obsahu vody v acetonu a suchých kryostatových řezů. Rovněž při aplikaci vychlazeného acetonu na podložní skla s tkáňovými řezy je nutné jejich rychlé přenesení do exsikátoru, z důvodu zamezení vysrážení vzdušné vlhkosti.

Rovněž jsme zjistili, že histologický průkaz jaterního GM1 gangliosidu detegovaného pomocí B podjednotky choleratoxinu nevykazuje po fixaci acetonem a 4% formaldehydem významné rozdíly. Odlišná situace nastává u mozkové tkáně, kde užití acetonu pravděpodobně vede k extrakci cholesterolu a tím je detekce GM1 mnohem ostřejší a výraznější. Uvedená data jsou v souladu s hypotézou Schwarze a Futermana (Schwarz et al. 2000), kteří uvádí, že v důsledku permeabilizace buněk acetonem dochází k lepšímu přístupu protilátek ke GSL. Ke stejným závěrům dospěla i skupina prof. Lingwooda (Lingwood 2005), která zmiňuje, že vazbě choleratoxinu ke GM1 může bránit cholesterol. Tato tvrzení jsou ve shodě s naším pozorováním, že GM1 je po fixaci acetonem v mozkové tkáni lépe zřetelný.

Naše závěry ukazují, že odstranění cholesterolu z jaterní tkáně není při imunohistologické detekci GM1 gangliosidu za využití choleratoxinu nezbytné, avšak v mozkové tkáni může cholesterol uvedené detekci stéricky bránit. Z tohoto důvodu je extrakce cholesterolu z mozkové tkáně více než žádoucí.

Po vyjasnění metodické části jsme se zabývali úlohou GSL v ochraně hepatocytů při cholestatickém onemocnění. Tato část práce si kladla za cíl odhalit možné změny v syntéze a distribuci jaterních gangliosidů, které nastávají v odpovědi na detergentní a prooxidační účinky akumulovaných ŽK doprovázejících cholestázu. V souladu s dříve publikovanými pracemi z našeho pracoviště (Jirkovská et al. 2007; Majer et al. 2007; Petr et al. 2014) jsme pozorovali zvýšenou koncentraci jaterních gangliosidů a aktivaci biosyntetické b– větve gangliosidů u cholestatických zvířat. GSL, vzhledem ke svým unikátním fyzikálním a chemickým vlastnostem, chrání buňky proti škodlivým vnějším faktorům vytvářením

rigidních domén odolných proti detergentům ve vnější vrstvě plasmatické membrány (Kanfer 1983; Hakomori 2003). Potlačení prooxidačních účinků akumulovaných ŽK při cholestáze za pomoci aktivace HMOX vedlo k částečnému návratu změn směrem ke kontrolním hodnotám. Tato data jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky naší pracovní skupiny, že aktivace HMOX má prostřednictvím vzniku biologicky aktivních produktů významný cytoprotektivní a antioxidační efekt (Zelenka et al. 2012). Pokud vezeme v potaz to, že gangliosidy samy o sobě mohou mít antioxidační účinky (Avrova et al. 1998; Gavella et al. 2007) a ovlivňovat fluiditu membrány u primárních hepatocytů (Sergent et al. 2005), můžeme se domnívat, že oxidační stres může být důležitým faktorem v regulaci biosyntézy gangliosidů a membránové stabilizaci během cholestázy indukované estrogeny.

Cholestáza není doprovázena pouhým zvýšením biosyntézy gangliosidů, ale také jejich přesunem z cytoplasmy do plasmatické membrány (Jirkovská et al. 2007). Ve shodě s publikovanými daty jsme v membránách cholestatických hepatocytů pozorovali zvýšený obsah GM1 gangliosidu. Kromě toho jsme u experimentální skupiny s cholestázou a současně indukovanou HMOX v membránách hepatocytů zaznamenali signifikantní pokles GM1 gangliosidu. O roli redistribuce GSL v rámci hepatocytu můžeme pouze spekulovat, protože GSL jsou součástí dynamických membránových raftů, které nemají pouze protektivní účinky proti detergentnímu vlivu ŽK, ale jsou součástí složitých signálních kaskád. Tato problematika bude vyžadovat další výzkum.

Abychom ověřili, že změny ve složení a redistribuci GSL u cholestázy jsou obecnějším jevem a nejsou specifické pouze pro jeden typ cholestázy, zvolili jsme pro další část našeho výzkumu model s mikročirurgickým podvazem segmentálních žlučovodů. Pro tento typ cholestázy je příznačné porušení toku žluče na úrovni žlučovodů, což má za následek mnohem vyšší sérové hladiny ŽK, bilirubinu a aktivity alkalické fosfatázy, než je tomu u cholestázy indukované estrogeny. Zvýšený oxidační stres, jenž je doprovodným jevem

cholestázy, je jedním z významných faktorů podílejícím se na poškození hepatocytů. Pokud snížíme úroveň oxidačního stresu například aktivací HMOX (Muchova et al. 2015), dochází u estrogeny indukované cholestázy ke snížení jaterního poškození. V našem modelu obstrukční cholestázy jsme pozorovali pouze snížení aktivity alkalické fosfatázy, zatímco sérové hladiny ŽK byly zvýšené. Naše pozorování může být vysvětlováno jiným typem cholestázy, který je kombinací mechanické obstrukce žlučových cest a změn v expresi membránových transportérů v játrech (Smid et al. 2016)

Podrobné analýzy ukázaly, že vlivem obstrukční i EE cholestázy dochází oproti kontrolnímu materiálu k významnému zvýšení koncentrace celkových gangliosidů, a to zejména GD1b a GT1b gangliosidu. Získaná data jsou v souladu s našimi dříve publikovanými pracemi (Jirkovská et al. 2007; Majer et al. 2007). Protektivní efekt zmnožení gangliosidů mimo jiné spočívá v tom, že jsou společně se sfingomyelinem a cholesterolem součástí membránových lipidních raftů, které jsou rezistentní vůči detergentním účinkům nahromaděných ŽK. Akumulované ŽK mohou svým detergentním účinkem porušit buněčné membrány, způsobit vznik a rozvoj oxidačního stresu s možným vyústěním v apoptózu či nekrózu buňky (Perez et al. 2009). Rafty jsou umístěné jak na sinusoidální (Zegers et al. 1998), tak na kanalikulární (Nourissat et al. 2008) straně hepatocytu a přispívají tak z obou stran k ochraně před škodlivými vlivy vnějšího prostředí.

V naší práci jsme dále potvrdili hypotézu, že modulace HMOX způsobí u obou typů cholestáz změny ve spektru gangliosidů. U extrahepatální cholestázy je vlivem aplikace heminu pozorováno statisticky významné snížení terminální části syntetické b- větve gangliosidů, avšak významné zmnožení celkových gangliosidů přetrvává. Stejný trend v redukci GD1b a GT1b byl pozorován také u EE cholestázy, ale celkový obsah gangliosidů již zvýšený nebyl. Aplikace EE vede ve srovnání s kontrolami k poklesu antioxidační kapacity séra (nepublikovaná data získaná k práci Petr et al. 2014), avšak podvaz segmentálních žlučodů

způsobí naopak její zvýšení (Muchova et al. 2011). Po podání heminu je pozorováno významné navýšení antioxidační kapacity séra, což může být připisováno zvyšující se koncentraci antioxidačně působícího bilirubinu. V obstrukčním modelu cholestázy nebyla v jaterní tkáni, oproti slepě operované kontrole, nalezena významná změna v antioxidační kapacitě. Tento jev může být vysvětlen silným prooxidačním působením ŽK a nižším obsahem nekonjugovaného bilirubinu, který je spotřebováván jako substrát při eliminaci ROS.

Vliv samotné aplikace EE žádné významné změny v distribuci GM1 oproti kontrolám nepřinesl, avšak podvaz žlučovodů má za následek významný přesun GM1 z cytoplasmy do sinusoidálních membrán hepatocytu. Indukce HMOX u zvířat s aplikovaným EE měla za následek významné změny v lokalizaci GM1 směrem do subsinusoidální oblasti cytoplasmy. Tato redistribuce GSL je společně se zvýšenou tvorbou bilirubinu, zprostředkovanou indukcí HMOX, odpovědná za signifikantní navýšení antioxidační kapacity séra. Popsané změny byly podpořeny imunologickou detekcí GM1 a byly v souladu s naším předchozím pozorováním. Navíc bylo pozorováno, že aplikace heminu zvířatům s obstrukční cholestázou vede ke zvýšení antioxidační kapacity séra, což může být způsobené kombinací vyššího obsahu celkových gangliosidů a indukované produkce bilirubinu. Zároveň byl u této skupiny pozorován významný přesun GM1 gangliosidu do cytoplasmatické oblasti hepatocytu, avšak aplikace SnMP měla za následek naopak zvýšenou detekci GM1 v sinusoidálních membránách.

Na základě získaných výsledků můžeme spekulovat o tom, že pozorované změny v lokalizaci a syntéze gangliosidů nejsou přísně specifické pro určitý typ cholestatického poškození, ale pravděpodobně se jedná o obecnější mechanismus hepatoprotekce. Naše popsané závěry dělají z HMOX ideální terapeutický cíl zejména pro onemocnění, na kterém se podílí oxidační stres, a tento klíčový enzym katabolické dráhy hemu si jistě zaslouží další podrobné studium.



## 6. ZÁVĚR

### 1) Optimalizace podmínek detekce jaterního GM1 gangliosidu pomocí B podjednotky cholera toxinu *in situ*

V této části práce jsme zjistili, že nejdůležitějším kritériem při fixaci glykosfingolipidů pomocí acetonu je docílení maximálního vysušení acetonu a suchých kryostatových řezů. Po aplikaci vychlazeného acetonu na podložní sklička s řezy tkání je nutné jejich následné rychlé přenesení do exsikátoru a zamezit tak vysrážení vzdušné vlhkosti. Pokud je jako biologický materiál použita jaterní tkáň, není při imunodetekci GM1 gangliosidu rozdíl mezi fixací acetonem a 4% formaldehydem. Naopak při fixaci mozkové tkáně acetonem dochází k extrakci cholesterolu, který stericky brání reakci protilátky s gangliosidy a následná detekce GM1 poskytuje (na rozdíl od formaldehydu) výraznější a ostřejší výsledek.

### 2) Vliv modulace HMOX na obsah a složení GSL v jaterní tkáni při cholestáze indukované estrogy

Tato studie prokázala, že vlivem vysokých koncentrací žlučových kyselin a oxidačního stresu dochází ke změnám v syntéze a distribuci jaterních gangliosidů. Jestliže u cholestatických zvířat indukujeme antioxidačně působící enzym HMOX, docílíme snížení oxidačního stresu a celkového obsahu gangliosidů směrem ke kontrolním hodnotám, které je doprovázeno přesunem GSL ze sinusoidálních membrán do cytosolového prostoru hepatocytu.

### 3) Změny ve složení a distribuci glykolipidů u obstrukční cholestázy

V této části disertační práce jsme potvrdili předpoklad, že mikrochirurgickým podvazem segmentálních žlučvodů dochází k výraznějším změnám ve spektru a distribuci glykosfingolipidů. Dle získaných výsledků můžeme spekulovat o tom, že změny ve spektru a

složení glykosfingolipidů nejsou specifické pro jednotlivé cholestatické typy, ale jedná se o obecnější mechanismus.

#### **4) Vliv modulace HMOX na obstrukční cholestázu**

V této části práce jsme se jako první zabývali problematikou modulace HMOX při obstrukční cholestáze. Prokázali jsme, že biologicky aktivní produkty katabolické dráhy hemu se podílejí na ochraně jater před prooxidačními účinky akumulovaných žlučových kyselin. Zároveň jsme zjistili, že aplikace heminu u obstrukčního typu cholestázy vede k významnému snížení terminální části syntetické b- větve ganglisodů, avšak zmnožení celkových gangliosidů přetrvává. Získaná data potvrzují hypotézu o kombinaci hepatoprotektivních účinku produktů katabolické dráhy hemu a glykosfingolipidů.

## 7. LITERATURA

- Alrefai WA and Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 24: 1803-23, 2007.
- Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S and Gaudio E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol.* 12: 3537-45, 2006.
- Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY and Gonchar VS. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 23: 945-52, 1998.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD and Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 16093-8, 2002.
- Bertoli E, Masserini M, Sonnino S, Ghidoni R, Cestaro B and Tettamanti G. Electron paramagnetic resonance studies on the fluidity and surface dynamics of egg phosphatidylcholine vesicles containing gangliosides. *Biochim Biophys Acta.* 647: 196-202, 1981.
- Boyer JL. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol.* 46: 365-71, 2007.
- Brůha R, Ehrmann J, Fejfar T, Jirsa M, Lata J, Mareček Z, Petrtýl J, Schneiderka P, Šafka V, Vaňásek T and Vitek L. Jaterní symptom. *Hepatologie.* 151, 2014.
- Burkart T, Siegrist HP, Herschkowitz NN and Wiesmann UN. 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. An optimized assay in homogenates of developing brain. *Biochim Biophys Acta.* 483: 303-11, 1977.

- Carey DJ and Hirschberg CB. Topography of Sialoglycoproteins and Sialyltransferases in Mouse and Rat-Liver Golgi. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 989-993, 1981.
- Cohen A, Hertz HS, Mandel J, Paule RC, Schaffer R, Sniegoski LT, Sun T, Welch MJ and White Et. Total serum cholesterol by isotope dilution/mass spectrometry: a candidate definitive method. *Clin Chem*. 26: 854-60, 1980.
- D'Angelo G, Polishchuk E, Di Tullio G, Santoro M, Di Campli A, Godi A, West G, Bielawski J, Chuang CC, van der Spoel AC, Platt FM, Hannun YA, et al. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature*. 449: 62-7, 2007.
- Dawson PA, Lan T and Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res*. 50: 2340-57, 2009.
- Ellerbe P, Meiselman S, Sniegoski LT, Welch MJ and White Et. Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. *Anal Chem*. 61: 1718-23, 1989.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD and Snyder SH. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol*. 1: 152-7, 1999.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226: 497-509, 1957.
- Fukasawa M, Nishijima M and Hanada K. Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*. 144: 673-85, 1999.
- Funk C. The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 4: 363-79, 2008.
- Furuya S, Hashikawa T, Irie F, Hasegawa A, Nakao T and Hirabayashi Y. Neuronal expression of a minor monosialosyl ganglioside GM1b in rat brain: immunochemical

- characterization using a specific monoclonal antibody. *Neurosci Res.* 22: 411-21, 1995.
- Furuya S, Irie F, Hashikawa T, Nakazawa K, Kozakai A, Hasegawa A, Sudo K and Hirabayashi Y. Ganglioside GD1 alpha in cerebellar Purkinje cells. Its specific absence in mouse mutants with Purkinje cell abnormality and altered immunoreactivity in response to conjunctive stimuli causing long-term desensitization. *J Biol Chem.* 269: 32418-25, 1994.
- Gault CR, Obeid LM and Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 688: 1-23, 2010.
- Gavella M, Kveder M, Lipovac V, Jurasin D and Filipovi-Vincekovic N. Antioxidant properties of ganglioside micelles. *Free Radic Res.* 41: 1143-50, 2007.
- Gibbs PEM, Tudor C and Maines MD. Biliverdin reductase: more than a namesake - the reductase, its peptide fragments, and biliverdin regulate activity of the three classes of protein kinase C. *Frontiers in Pharmacology.* 3, 2012.
- Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Tametani T and Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver - Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *Journal of Clinical Investigation.* 101: 604-612, 1998.
- Green R. M CJM. Hepatocellular cholestasis: pathobiology and histological outcome. *Semin Liver Dis.* 15: 372-89, 1995.
- Hakomori S. Serological cancer markers. S. Sell. Tootwa NJ, The Human Press 1992, 207-232.
- Hakomori S. Role of gangliosides in tumor progression. *Prog Brain Res.* 101: 241-50, 1994.
- Hakomori S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol.* 10: 16-24, 2003.

- Hakomori S and Kannagi R. Glycosphingolipids as Tumor-Associated and Differentiation Markers. *Journal of the National Cancer Institute*. 71: 231-251, 1983.
- Hakomori SI. Levine, Philip Award Lecture - Blood-Group Glycolipid Antigens and Their Modifications as Human Cancer Antigens. *American Journal of Clinical Pathology*. 82: 635-648, 1984.
- Halter D, Neumann S, van Dijk SM, Wolthoorn J, de Maziere AM, Vieira OV, Mattjus P, Klumperman J, van Meer G and Sprong H. Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol*. 179: 101-15, 2007.
- Hamilton PW. Designing a morphometric study. *Quantitative Clinical Pathology*. A. D. C. Hamilton P W. Oxford, Blackwell Science 1995, 311-315
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M and Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*. 426: 803-9, 2003.
- Hansson HA, Holmgren J and Svennerholm L. Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74: 3782-6, 1977.
- Hara E, Takahashi K, Takeda K, Nakayama M, Yoshizawa M, Fujita H, Shirato K and Shibahara S. Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors. *Biochemical Pharmacology*. 58: 227-236, 1999.
- Harris PL, Harvey DR and Bliss BP. The importance of plasma lipid, glucose, insulin and fibrinogen in femoropopliteal surgery. *Br J Surg*. 65: 197-200, 1978.
- Chandra P and Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res*. 21: 719-35, 2004.
- Chark D, Nutikka A, Trusevych N, Kuzmina J and Lingwood C. Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosyl ceramide by verotoxins and a monoclonal

- antibody - Role in human renal glomerular binding. *European Journal of Biochemistry*. 271: 405-417, 2004.
- Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. *Eur J Biochem*. 257: 293-8, 1998.
- Iber H, Zacharias C and Sandhoff K. The C-Series Ganglioside-Gt3, Ganglioside-Gt2 and Ganglioside-Gp1c Are Formed in Rat-Liver Golgi by the Same Set of Glycosyltransferases That Catalyze the Biosynthesis of Asialo-Series, a-Series and B-Series Gangliosides. *Glycobiology*. 2: 137-142, 1992.
- Iuliano L, Piccheri C, Coppola I, Pratico D, Micheletta F and Violi F. Fluorescence quenching of dipyridamole associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. *Biochim Biophys Acta*. 1474: 177-82, 2000.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW and Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 100: 879-87, 2002.
- Jenkins RW CD, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal*. 21: 836-46, 2009.
- Jirkovská M, Majer F, Smidova J, Stritesky J, Shaik GM, Draber P, Vitek L, Marecek Z and Smid F. Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. *Glycoconj J*. 24: 231-41, 2007.
- Kanfer JN, Hakomori, S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Sphingolipid Biochemistry*. H. S. Kanfer JN. New York, Plenum Press. *Handbook of Lipid Research* 1983, 327-379.
- Keyse SM and Tyrrell RM. Heme Oxygenase Is the Major 32-Kda Stress Protein-Induced in Human-Skin Fibroblasts by Uva Radiation, Hydrogen-Peroxide, and Sodium Arsenite.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86: 99-103, 1989.
- Kolter T, Proia RL and Sandhoff K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem.* 277: 25859-62, 2002.
- Kolter T and Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 81-103, 2005.
- Kotani M, Kawashima I, Ozawa H, Terashima T and Tai T. Differential Distribution of Major Gangliosides in Rat Central-Nervous-System Detected by Specific Monoclonal Antibodies. *Glycobiology.* 3: 137-146, 1993.
- Kuikka M, Ramstedt B, Ohvo-Rekila H, Tuuf J and Slotte JP. Membrane properties of D-erythro-N-acyl sphingomyelins and their corresponding dihydro species. *Biophysical Journal.* 80: 2327-2337, 2001.
- Kusunoki S, Chiba A, Hirabayashi Y, Irie F, Kotani M, Kawashima I, Tai T and Nagai Y. Generation of a monoclonal antibody specific for a new class of minor ganglioside antigens, GQ1b alpha and GT1a alpha: its binding to dorsal and lateral horn of human thoracic cord. *Brain Res.* 623: 83-8, 1993.
- Kusunoki S, Chiba A, Shimizu T and Kanazawa I. Unique Localization of Fucosyl Gm1 in Rabbit Spinal-Cord and Peripheral-Nerve - Immunohistochemical Study Using Monoclonal Anti-Fucosyl Gm1 Antibody Crd73-6. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism.* 1214: 27-31, 1994.
- Lannert H, Bunning C, Jeckel D and Wieland FT. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 342: 91-6, 1994.
- Ledeen RW, Yu RK and Eng LF. Gangliosides of human myelin: sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. *J Neurochem.* 21: 829-39, 1973.



- Lerner-Marmarosh N, Shen J, Torno MD, Kravets A, Hu Z and Maines MD. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 7109-14, 2005.
- Lester R, Behrman RE and Lucey JF. Transfer of Bilirubin-C14 across Monkey Placenta. *Pediatrics*. 32: 416-9, 1963.
- Lingwood C, Mahfound, R. Satellite Meeting of XVIII. International Symposium on Glycoconjugates, Siena, Italy. 2005.
- Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI and Durante W. Antiapoptotic action of carbon monoxide on cultured vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 228: 572-5, 2003.
- Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 2: 2557-68, 1988.
- Maines MD and Gibbs PEM. 30 some years of heme oxygenase: From a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338: 568-577, 2005.
- Majer F, Trnka L, Vitek L, Jirkovska M, Marecek Z and Smid F. Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver. *Biomed Chromatogr*. 21: 446-50, 2007.
- Marek J. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Grada Publishing, Praha 2010.
- Meyers M, Slikker W, Pascoe G and Vore M. Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 214: 87-93, 1980.
- Motterlini. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo (vol 83, pg 568, 1998). *Circulation Research*. 83: 1289-1289, 1998.

- Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ and Winslow RM. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res.* 83: 568-77, 1998.
- Motterlini RaF, R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): A stratagem to emulate the beneficial effects of heme oxygenase-1. Heme oxygenase. L. E. Otterbein, Zuckerbraun B. S. New York Nova Science Publishers 2005, 191-210.
- Muchova L, Vanova K, Suk J, Micuda S, Dolezelova E, Fuksa L, Cerny D, Farghali H, Zelenkova M, Lenicek M, Wong RJ, Vreman HJ, et al. Protective effect of heme oxygenase induction in ethinylestradiol-induced cholestasis. *J Cell Mol Med.* 19: 924-33, 2015.
- Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, Sticova E, Vreman HJ, Wong RJ and Vitek L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 15: 1156-65, 2011.
- Neumann S and van Meer G. Sphingolipid management by an orchestra of lipid transfer proteins. *Biol Chem.* 389: 1349-60, 2008.
- Nourissat P, Travert M, Chevanne M, Tekpli X, Rebillard A, Le Moigne-Muller G, Rissel M, Cillard J, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D and Sergent O. Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology.* 47: 59-70, 2008.
- O'Brien JS and Kishimoto Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.* 5: 301-8, 1991.
- Otterbein L, Chin BY, Otterbein SL, Lowe VC, Fessler HE and Choi AM. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol.* 272: L268-75, 1997.

- Pagano RE. Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids. *Curr Opin Cell Biol.* 2: 652-63, 1990.
- Pascher I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta.* 455: 433-51, 1976.
- Perez MJ and Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 15: 1677-89, 2009.
- Petr T, Smid V, Kucerova V, Vanova K, Lenicek M, Vitek L, Smid F and Muchova L. The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis. *Physiol Res.* 63: 359-67, 2014.
- Petr T, Smid V, Smidova J, Hulkova H, Jirkovska M, Elleder M, Muchova L, Vitek L and Smid F. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. *Eur J Histochem.* 54: 112-117, 2010.
- Pohlentz G, Klein D, Schwarzmann G, Schmitz D and Sandhoff K. Both Ga2, Gm2, and Gd2 Synthases and Gm1b, Gd1a, and Gt1b Synthases Are Single Enzymes in Golgi Vesicles from Rat-Liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 85: 7044-7048, 1988.
- Rahmann H. Memory Formation by Means of Molecular Facilitation in Synapses with Gangliosides. *Funktionelle Biologie & Medizin.* 4: 249-261, 1985.
- Reyes H and Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. *Semin Liver Dis.* 13: 289-301, 1993.
- Rodriguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2: 150-8, 2003.

- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D and Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.* 234-235: 249-63, 2002.
- Sandhoff K and Vanechten G. Ganglioside Metabolism - Enzymology, Topology and Regulation. *Biological Function of Gangliosides.* 101: 17-29, 1994.
- Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, Shinoda Y, Goda N, Yamaguchi T, Nimura Y, Ishimura Y and Suematsu M. Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol.* 272: G1268-75, 1997.
- Sardana MK, Drummond GS, Sassa S and Kappas A. The potent heme oxygenase inducing action of arsenic and parasitocidal arsenicals. *Pharmacology.* 23: 247-53, 1981.
- Sekine T, Miyazaki H and Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290: F251-61, 2006.
- Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L and Lagadic-Gossmann D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 313: 104-11, 2005.
- Sherlock S. DJ. Nemoci jater a žlučových cest. Olga Čermáková, Hradec Hrálové 2004.
- Shibahara S YM, Suzuki H, Takeda K, Meguro K, Endo K. Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J Biochem.* 113: 214-218, 1993.
- Schengrund CL. "Multivalent" saccharides: development of new approaches for inhibiting the effects of glycosphingolipid-binding pathogens. *Biochem Pharmacol.* 65: 699-707, 2003.
- Schenker S, Dawber NH and Schmid R. Bilirubin Metabolism in the Fetus. *J Clin Invest.* 43: 32-9, 1964.

- Schmid R. The distinguished lecture: Pyrrolic victories. *Trans Assoc Am Physicians*. 89: 64-76, 1976.
- Schreiber AJ and Simon FR. Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment. *Hepatology*. 3: 607-13, 1983.
- Schwarz A and Futerman AH. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1286: 247-67, 1996.
- Schwarz A and Futerman AH. Determination of the localization of gangliosides using anti-ganglioside antibodies: Comparison of fixation methods. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 45: 611-618, 1997.
- Schwarz A and Futerman AH. Immunolocalization of gangliosides by light microscopy using anti-ganglioside antibodies. *Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Pt B*. 312: 179-187, 2000.
- Schwarzmann G and Sandhoff K. Metabolism and Intracellular-Transport of Glycosphingolipids. *Biochemistry*. 29: 10865-10871, 1990.
- Smid V, Petr T, Vanova K, Jasprova J, Suk J, Vitek L, Smid F and Muchova L. Changes in Liver Ganglioside Metabolism in Obstructive Cholestasis - the Role of Oxidative Stress. *Folia Biol (Praha)*. 62: 148-59, 2016
- Sonnino S, Mauri L, Chigorno V and Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*. 17: 1R-13R, 2007.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN. Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. *Science*. 235: 1043-1046, 1987.
- Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta*. 24: 604-11, 1957.

- Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem.* 10: 613-23, 1963.
- Svennerholm L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res.* 101: XI-XIV, 1994.
- Šmíd F. Gangliosidy - izolace, separace, využití. Kandidátská disertační práce PŘF UK. 71-74, 1991.
- Šmíd F LJ, Petr T, Šmídová J, Vítek L Methods Based on Binding Affinity of the B-Subunit of Cholera Toxin to Gangliosides in Biochemistry and Histology. 2011.
- Takahashi K, Hara E, Suzuki H, Sasano H and Shibahara S. Expression of heme oxygenase isozyme mRNAs in the human brain and induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J Neurochem.* 67: 482-9, 1996.
- Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T and Shibahara S. Identification of a Cis-Acting Element That Is Responsible for Cadmium-Mediated Induction of the Human Heme Oxygenase Gene. *Journal of Biological Chemistry.* 269: 22858-22867, 1994.
- Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 61: 748-55, 1968.
- Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 244: 6388-94, 1969.
- Tenhunen R, Ross ME, Marver HS and Schmid R. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry.* 9: 298-303, 1970.
- Tettamanti G, Masserini M, Giuliani A and Pagani A. Structure and function of gangliosides. *Ann Ist Super Sanita.* 24: 23-31, 1988.
- Tettamanti G and Riboni L. Gangliosides and Modulation of the Function of Neural Cells. *Advances in Lipid Research, Vol 25.* 25: 235-267, 1993.

- Thiagarajah JR and Verkman AS. New drug targets for cholera therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 26: 172-5, 2005.
- Trauner M and Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83: 633-71, 2003.
- Trauner M, Meier PJ and Boyer JL. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol.* 31: 165-78, 1999.
- Ueno K, Ando S and Yu RK. Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin. *J Lipid Res.* 19: 863-71, 1978.
- van Meer G, Wolthoorn J and Degroote S. The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358: 869-73, 2003.
- Vandborg PK, Hansen BM, Greisen G, Jepsen M and Ebbesen F. Follow-up of Neonates With Total Serum Bilirubin Levels  $\geq 25$  mg/dL: A Danish Population-Based Study. *Pediatrics.* 130: 61-66, 2012.
- Vanova K, Suk J, Petr T, Cerny D, Slanar O, Vreman HJ, Wong RJ, Zima T, Vitek L and Muchova L. Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics. *Biochimie.* 97: 173-80, 2014.
- Vítek L. Bilirubin a interní choroby. Bilirubin a interní choroby. J. M. Červinková Z, Mareček Z. Praha, Grada Publishing, a. s. 2009, 136.
- Vitek L and Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem.* 43: 1-57, 2007.
- Vore M. Estrogen cholestasis. Membranes, metabolites, or receptors? *Gastroenterology.* 93: 643-9, 1987.
- Vreman HJ and Stevenson DK. Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. *Anal Biochem.* 168: 31-8, 1988.

- Wu L. The pro-oxidant role of methylglyoxal in mesenteric artery smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 83: 63-8, 2005.
- Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D and Carey D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol.* 69: 683-8, 1991.
- Wunder C and Potter RF. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 3: 199-208, 2003.
- Xu YH, Barnes S, Sun Y and Grabowski GA. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *Journal of Lipid Research.* 51: 1643-1675, 2010.
- Xue H, Guo H, Li YC and Hao ZM. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects liver cells from ischemia/reperfusion injury in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol.* 13: 5384-90, 2007.
- Yamaji T, Kumagai K, Tomishige N and Hanada K. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *Iubmb Life.* 60: 511-518, 2008.
- Yoshida T and Kikuchi G. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J Biol Chem.* 253: 4230-6, 1978.
- Zegers MM and Hoekstra D. Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem J.* 336 ( Pt 2): 257-69, 1998.
- Zelenka J, Muchova L, Zelenkova M, Vanova K, Vreman HJ, Wong RJ and Vitek L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. *Biochimie.* 94: 1821-7, 2012.



## 8. PŘÍLOHY

### Příloha 1

Petr T, Šmíd V, Šmídová J, Hůlková H, Jirkovská M, Elleder M, Muchová L, Vítek L, Šmíd F. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction.

**European Journal of Histochemistry** 2010; 12;54(2):e23.

**IF= 1,809**

### Příloha 2

Šmíd F, Ledvinová J, Petr T, Šmídová J, Vítek L. Methods Based on Binding Affinity of the B-Subunit of Cholera Toxin to Gangliosides in Biochemistry and Histology (kapitola v knize **Cholera: Symptoms, Diagnosis and Treatment**, Editor: Evelyn L. Melbourne, ISBN: 978-1-61761-789-8, © 2010 Nova Science Publishers, Inc.)

### Příloha 3

Petr T, Šmíd V, Kučerová V, Váňová K, Leníček M, Vítek L, Šmíd F, Muchová L. The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen– induced cholestasis.

**Physiological Research** 2014; 63(3):359–67.

**IF= 1,293**

### Příloha 4

Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, Sticova E, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress.

**Journal of Cellular and Molecular Medicine** 2011; 15(5):1156-65.doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01098.x. **IF= 4,125**

#### **Příloha 5**

Šmíd V, Petr T, Váňová K, Jašprová J, Šuk J, Vítek L, Šmíd F, Muchová L. Changes in liver ganglioside metabolism in obstructive cholestasis– the role of oxidative stress.

**Folia Biologica** 2016; 62:148–159. **IF= 0,833**

## 8.1. Příloha 1

Petr T, Šmíd V, Šmídová J, Hůlková H, Jirkovská M, Elleder M, Muchová L, Vítek L, Šmíd F. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. **European Journal of Histochemistry** 2010; 12;54(2):e23.

## Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for *in situ* detection with special emphasis to acetone pre-extraction

T. Petr,<sup>1</sup> V. Šmíd,<sup>1</sup> J. Šmídová,<sup>2</sup>  
H. Hütková,<sup>3</sup> M. Jirkovská,<sup>3</sup> M. Elleder,<sup>3</sup>  
L. Muchová,<sup>1</sup> L. Vitek,<sup>1,4</sup> F. Šmíd<sup>1</sup>

Charles University in Prague, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine <sup>1</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, <sup>2</sup>Institute of Histology, <sup>3</sup>Institute of Inherited Metabolic Disorders, <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Prague, Czech Republic

### Abstract

A comparison of histochemical detection of GM1 ganglioside in cryostat sections using cholera toxin B-subunit after fixation with 4% formaldehyde and dry acetone gave tissue-dependent results. In the liver no pre-treatment showed detectable differences related to GM1 reaction products, while studies in the brain showed the superiority of acetone pre-extraction (followed by formaldehyde), which yielded sharper images compared with the diffuse, blurred staining pattern associated with formaldehyde. Therefore, the aim of our study was to define the optimal conditions for the GM1 detection using cholera toxin B-subunit.

Ganglioside extractability with acetone, the ever neglected topic, was tested comparing anhydrous acetone with acetone containing admixture of water. TLC analysis of acetone extractable GM1 ganglioside from liver sections did not exceed 2% of the total GM1 ganglioside content using anhydrous acetone at -20°C, and 4% at room temperature. The loss increased to 30.5% using 9:1 acetone/water. Similarly, photometric analysis of lipid sialic acid, extracted from dried liver homogenates with anhydrous acetone, showed the loss of gangliosides into acetone 3.0±0.3% only. The loss from dried brain homogenate was 9.5±1.1%.

Thus, anhydrous conditions (dry tissue samples and anhydrous acetone) are crucial factors for optimal *in situ* ganglioside detection using acetone pre-treatment. This ensures effective physical fixation, especially in tissues rich in polar lipids (precipitation, prevention of *in situ* diffusion), and removal of cholesterol, which can act as a hydrophobic blocking barrier.

### Introduction

Gangliosides are charged glycosphingolipids (GSLs) containing one or more sialic acid residues in their carbohydrate chains. They are highly enriched in the outer leaflet of the plasma membrane and most of their functions are associated with this location. In contrast to glycerolipids, GSLs are more rigid molecules, and therefore protect cells against harmful environmental factors by keeping the outer leaflet of the plasma membrane mechanically stable and chemically resistant.<sup>1,2</sup> Carbohydrate moieties of gangliosides function as surface antigens, receptors for bacteria, bacterial toxins, viruses, and other bioactive molecules. Quantities and types change during development, differentiation, tumorigenesis, cell adhesion, and signal transduction.<sup>4</sup> *In situ* detection of GSLs in tissue sections is important for reliable information on their subcellular distribution. GM1 ganglioside is used as the representative member of the GSL family. The detection of GM1 is based on its strong binding affinity with cholera toxin B-subunit, which is highly sensitive for GM1, thus detecting this predominantly among all other gangliosides.<sup>2,7</sup> It can occur an additional staining due to binding of the other gangliosides, mainly GD1b, but its resolution from GM1 in histochemical detection is not possible. TLC analysis of gangliosides with resorcinol and cholera toxin staining should bring attention to unusual samples with high ratio of other gangliosides to GM1. Comparison of GM1 detection with cholera toxin and with anti-GM1 monoclonal antibody was referred by Kotani *et al.*<sup>8</sup>

GM1 detection is also widely used for detection of glycolipid-enriched membrane microdomains, called rafts. The fluctuations in cell surface glycolipid signaling molecules, at ultramicroscopic level, has been demonstrated in connection with fluorescence-topographic imaging at nano scale optical microscopy.<sup>9</sup>

The use of proper fixation technique is generally considered crucial for immunohistological detection of GSLs.<sup>10</sup> Acetone fixation of cryostat sections is recommended and preferred to formaldehyde, as it provides better accessibility of antibodies or bacterial ligands to GSLs.<sup>8,11</sup> For this reason, acetone fixation has been used in several studies.<sup>8,12,13</sup>

The first report on the effect of water in acetone on extraction of polar lipids was published by an author of our group.<sup>14</sup> In this report, it was demonstrated that the water content of acetone used during the extraction procedure, and even the water content of the treated samples, affects the degree of polar lipid extraction.

Since then, acetone fixation has been used in several studies.<sup>8,12,13</sup> However, these studies did not mention whether water was excluded

Correspondence: František Šmíd, Associate Professor of Medical Biochemistry, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Bojišti 3 12808 Prague 2, Czech Republic.

Tel. +420.224964197 - Fax: +420.224964203.  
E-mail: smid@cesnet.cz

Key words: fixation, GM1 ganglioside, cholera toxin, anhydrous acetone, 4% formaldehyde.

Acknowledgements: this research was supported by a governmental grant No. NR/9366-3 given by the Czech Ministry of Health and grant SVV-2010-260512. The authors want to thank Prof. Dr. C. A. Lingwood (University of Toronto) for valuable suggestions and comments and O. Švejčková for technical assistance.

Received for publication: 17 November 2009.  
Accepted for publication: 22 March 2010.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright T. Petr *et al.*, 2010

Licensee PAGEPress, Italy  
European Journal of Histochemistry 2010; 54:e23  
doi:10.4081/ejh.2010.e23

from the acetone step, as even whether the water content of the studied sample might contribute to significant extraction of highly polar lipids.<sup>15</sup> The aim of the present study was to define the optimal conditions for the detection of GM1 using cholera toxin B-subunit by comparing formaldehyde fixation, acetone pre-extraction or a combination of both (acetone + formaldehyde sequence) in tissues with different polar lipid content; in this study liver and brain were used as representative tissues with significantly different polar lipid content.

### Materials and Methods

#### Chemicals

Paraformaldehyde, cholera toxin B-subunit biotin-labeled (ChT-B-biotin), streptavidin-peroxidase-polymer, albumin, biotin, and diaminobenzidine (DAB)-tetrahydrochloride tablets were supplied by Sigma (St Louis, MO, USA); avidin was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); cholera toxin B-subunit conjugated with peroxidase (ChT-B-Px) came from List laboratories (USA) and DEAE Sephadex was supplied by GE (Healthcare, UK). All other chemicals were purchased locally from Penta (Czech Republic).

#### Experimental animals

Female Wistar rats (Anlab, Prague, Czech

Republic) were housed under controlled temperature and a natural light-dark cycle. Liver and brain samples were taken from the Wistar rats and snap frozen.

All aspects of the study met the accepted criteria for the experimental use of laboratory animals and all protocols were approved by the Animal Research Committee of the 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

### Preparation of fixatives

Formaldehyde: 4% formaldehyde was freshly prepared by depolymerization of paraformaldehyde.

Dry acetone: 1000 mL of acetone was dried over 100-150 g of anhydrous calcium chloride in a closed glass bottle (with occasional mixing) for several days, then decanted and distilled under elimination of air moisture. The obtained dry acetone was stored in tightly closed bottles.

### Quantification of GM1 ganglioside extraction with acetone from liver sections

Twelve 6 µm cryostat sections from normal rat liver were cut and placed on the same microscopic slide. One slide, containing 12 sections, represented one sample for TLC densitometry. The samples (slides) used in each extraction were in triplicates.

The loss of GM1 ganglioside during acetone fixation was studied by comparison of the following extractions:

1) The samples (slides) were extracted directly with chloroform-methanol-water (C-M-W) 10:10:1 v/v/v with shaking on an orbital shaker at room temperature (25°C) for 10 min. These samples were used to measure the total quantity of GM1 in the tissue sections.

2) Other samples were extracted with i) dry acetone at room temperature for 15 min, ii) dry acetone at -20°C for 15 min, and iii) a cold acetone-water 9:1 v/v mixture, at -20°C for 15 min.

The samples from the acetone extraction were re-extracted with C-M-W 10:10:1 v/v/v by shaking at room temperature for 10 min.

All extracts were evaporated under a stream of nitrogen, dissolved in chloroform-methanol 1:1 v/v, and then applied onto HPTLC aluminium sheets of silica gel (Merck; Darmstadt, Germany). Chromatograms from the experiments were developed in a solvent mixture C:M:0.2% aqueous CaCl<sub>2</sub> (50:45:11). After drying, the silica gel layer was impregnated with 0.1% polyisobutylmethacrylate in cyclohexane. Non-specific binding was blocked using 1% BSA in PBS. Thereafter, the biotin-labeled cholera toxin B-subunit (diluted 1:300) was bound to the GM1 ganglioside at room temper-

ature for 30 min. After extensive washing, streptavidin-peroxidase-polymer (diluted 1:400) was used for ultra-sensitive binding to biotin and amplification of the peroxidase enzyme signal. After washing, a blue reaction product was formed by reaction of the peroxidase with a solution of 1-chloronaphthol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a citrate phosphate buffer (pH=7.2).

Densitometry of the chromatogram in reflectance mode at 580 nm (CAMAG TLC Scanner II, Switzerland) was used for evaluation of the percentage distribution of GM1, in both the acetone and C-M-W extracts.

### Quantification of acetone extraction of gangliosides from dried liver and brain homogenates

A very fine-grained homogenates were prepared from 1 g of liver and 0.5 g of brain, dried using a two-day lyophilization and then rapidly transferred into desiccator (to eliminate condensation of air moisture on the cold samples). One group of samples was extracted with C-M-W (4:8:3) repeated extractions (3x) with shaking (extracts A, n=6). The collected extracts represented the total gangliosides in the sample. The second group was extracted with dry acetone at room temperature for 15 min with shaking (extracts B, n=6) and afterwards re-extracted (3x) with C-M-W (4:8:3) using the same extraction technique described for extract A (extracts C, n=6).

Gangliosides from the extracts were isolated with ion exchange chromatography (DEAE Sephadex), base treatment, dialysis and silica gel column chromatography according to the procedure described by Ledeen *et al.*<sup>16</sup> Total gangliosides (total lipid sialic acid) in the extracts were determined using the resorcinol-HCl method.<sup>17</sup>

### Histochemical detection of GM1 ganglioside in rat liver sections

Cryostat liver sections 6 µm thick were dried overnight at room temperature, and fixed with freshly prepared 4% formaldehyde at room temperature for 5 min. The parallel sections were fixed in dry acetone at -20°C for 2 or 15 min, then briefly transferred into a desiccator in order to eliminate air moisture condensation on the cold microscopic slides and thereby dilution of the acetone with condensed water. The influence of temperature on GM1 extraction from liver sections was studied by comparing fixation with dry acetone at -20°C for 2 or 15 min and fixation at room temperature for 2 or 15 min. The effect of the water content in the acetone fixative was studied in a further experiment comparing fixation using dry acetone with an acetone-water mixture (9:1 v/v), both at -20°C for 15 min. After acetone fixation, liver sections were dried in desiccator at

room temperature and then put into PBS.

Histochemical detection of GM1 ganglioside was performed with ChT-B-biotin, according to the procedure described by Jirkovská *et al.*<sup>18</sup> In brief, the endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in PBS, supplemented by 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.1% sodium azide. Endogenous biotin was blocked using a blocking kit (DakoCytomation, Denmark). In order to block non-specific binding, sections were treated with 3% BSA in PBS for 15 min. Sections were then incubated with ChT-B-biotin, diluted 1:300 with PBS plus 3% BSA, for 16.5 h at 8°C. After washing with PBS, the sections were incubated with streptavidin-peroxidase-polymer diluted 1:400 with PBS at room temperature for 60 min. Peroxidase activity was visualized using DAB tetrahydrochloride in darkness for 20 min.

In each series two control tests were included. First, ChT-B-biotin was omitted in a negative test; second, fixed sections were extracted with a C:M (1:1 v/v) and C-M-W 1:1:0.3 v/v/v mixtures at room temperature, both for 15 min with shaking before detection of GM1. In order to obtain comparable results, corresponding areas were selected on parallel liver sections and photographed under constant exposure conditions.

### Densitometric analysis of GM1 ganglioside in tissue sections

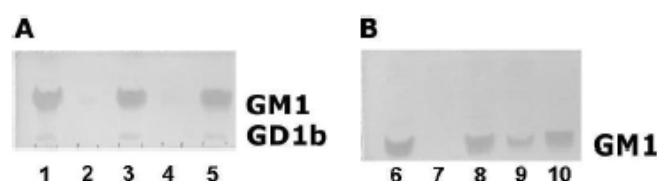
Liver sections obtained from 23 Wistar rats were analyzed. In each animal, the optical density of GM1 staining in formaldehyde-fixed samples represented 100% and the density of GM1 staining after acetone fixation was expressed as a proportion.

The mean optical density of the GM1 ganglioside reaction product in liver parenchyma was measured using an Olympus Cue 2 densitometric program at 70 areas in each section, at a magnification of 500x. Areas of sections containing either large vessels or technical artifacts (disruptions, etc.) were excluded from measurements.

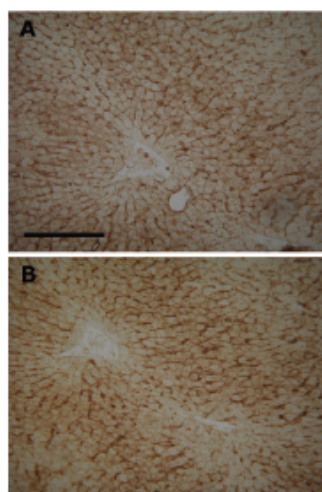
### Comparison of histochemical detection of GM1 ganglioside in rat liver and brain sections

Parallel cryostat sections from liver tissues were treated with the following fixatives: 1) 4% formaldehyde; 2) anhydrous acetone. Sections from brain tissue were fixed with: 1) formaldehyde; 2) Baker's solution (formaldehyde containing calcium chloride); 3) acetone followed by formaldehyde (A+F); and 4) acetone followed by Baker's solution (A+B). Acetone followed by formaldehyde gave better-preserved morphology than acetone alone. After acetone fixation, liver and brain sections were dried in a desiccator, put into formaldehyde or Baker's





**Figure 1.** TLC of gangliosides extracted under various conditions. (A) Effect of temperature on dry acetone extractability of GM1 ganglioside. (1) direct extraction with C-M-W; (2) extract with dry acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (3): C-M-W extract after previous extraction with dry acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (4): acetone extract at room temperature; (5): C-M-W extract after previous extraction with dry acetone at room temperature. Note: GM1 ganglioside detected with ChTB (GD1b ganglioside band was also detected with much lower sensitivity). GM1 content in all acetone extracts was below the detection level of very sensitive cholera toxin staining. (B) Comparison of GM1 extraction with dry acetone and with aqueous acetone. (6) Direct extraction with C-M-W; (7) extract with dry cold acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (8): C-M-W extract after previous extraction with dry acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (9) extracts with mixture acetone-water 9:1 shows significant loss of GM1; (10) C-M-W extracts after previous extraction with acetone-water mixture.



**Figure 2.** Histochemical detection of GM1 ganglioside in liver cryostat sections after various fixation conditions. Fixation with (A) dry cold acetone for 15 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  and with (B) 4% formaldehyde for 5 minutes at room temperature gave comparable results. Rat liver cryostat sections stained with cholera toxin B-subunit. Bar 200  $\mu\text{m}$ .

solution and then into PBS. Histochemical detection of GM1 ganglioside was performed using cholera toxin B-subunit labeled with peroxidase (ChT-B-Px) diluted 1:500 with PBS plus 3% BSA and incubated for 16.5 h at  $8^{\circ}\text{C}$ . Cell nuclei were counterstained with hematoxylin. Other steps were applied according to the previously mentioned staining protocol

(see above), except for blocking of biotin.

Unmasking treatment (cholesterol removal) with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) was performed on brain sections only. 12 mM MCD in PBS was used for 30 min at room temperature and for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . A 20 mM MCD concentration was used for 30 min at room temperature. After MCD treatment, sections were briefly washed in PBS and then fixed with formaldehyde.

#### Determination of cholesterol

Cholesterol was determined in the lipid extracts from both rat liver and brain samples using gas chromatography, with isotope dilution mass spectrometry,<sup>29</sup> using D7-cholesterol as the internal standard.

#### Statistical analysis

SigmaStat software (Jandel Scientific) was used for statistical analyses. Data are presented as the median and IQ range, and assessed using the Mann Whitney rank sum test. A  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

#### Effect of different fixation procedures on GM1 ganglioside extraction from the liver sections

The loss of GM1 ganglioside due to the fixation of dry cryostat liver sections with dry acetone was studied and compared with those samples extracted with chloroform-methanol-water 10:10:1 v/v/v (taken as 100% of GM1). First, the effect of the temperature of dry acetone was studied at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $25^{\circ}\text{C}$ ; the sec-

tions extracted with acetone were re-extracted with C-M-W 10:10:1. The results of the TLC of gangliosides in extracts stained with the cholera toxin B-subunit are shown in Figure 1A. A similar procedure was used to demonstrate the effect of water content in acetone on the extraction of gangliosides (Figure 1B).

Both chromatograms were evaluated using densitometry. Figures 1A and 1B illustrate that the GM1 content from dry acetone extracts was not detectable, even when the highly sensitive cholera toxin method was used (Figure 1). The greatest part of GM1 persisted after acetone fixation and extraction; and it was extracted by the C-M-W re-extraction. Therefore, the percentage of GM1 in the acetone extracts was counted as the difference between the mean density of GM1 from samples extracted directly with C-M-W 10:10:1 v/v/v (taken as 100% of GM1) minus the mean density detected in C-M-W re-extracts. GM1 content in C-M-W re-extracts was 98.1% after cold acetone, and 96.2% after acetone at  $25^{\circ}\text{C}$  (i.e., the loss of GM1 was 1.9% with dry acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$  and 3.8% at  $25^{\circ}\text{C}$ , respectively). On the other hand, the acetone-water mixture (9:1) yielded a remarkable 30.5% loss of GM1 (Figure 1B, line 9). The almost ten times higher extraction of GM1 in acetone-water (9:1) extract demonstrates that the water content in acetone has a significant effect on GM1 extraction.

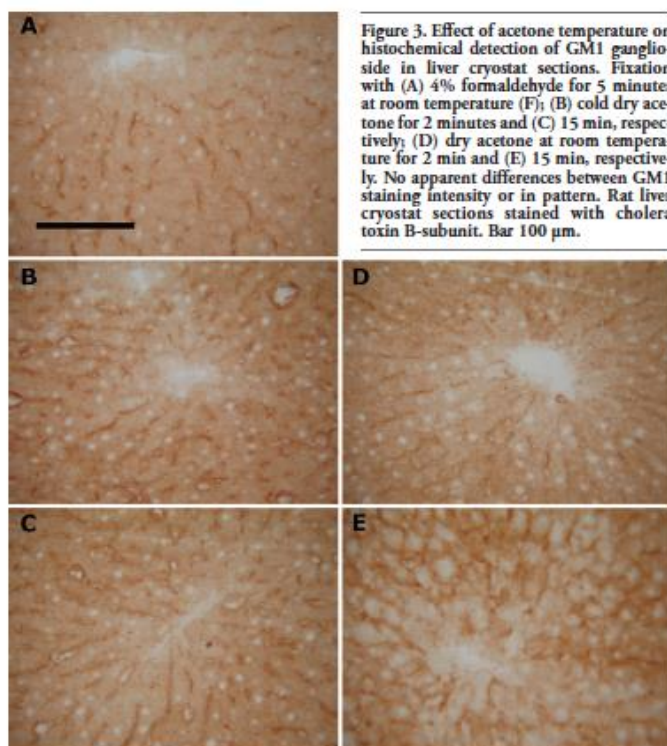
#### Effect of fixation procedures studied on liver and brain dried homogenates

The semi-quantitative results obtained from the densitometry of chromatograms were supported by a quantitative determination (photometric resorcinol-HCl method) of the loss of total gangliosides from dried liver and brain homogenate into acetone.

The mean value of the amount of total gangliosides extracted with C-M-W (4:8:3) from dried liver and brain homogenate (extract A) was taken as 100% of total gangliosides. The loss of gangliosides from liver into acetone at room temperature (extract B) was  $3.0 \pm 0.3\%$  and from brain  $9.5 \pm 1.1\%$  and in the C-M-W re-extract of liver (extract C) remained  $97.0 \pm 0.3\%$ , and in re-extracts from brain about 90.5%.

#### Histochemical detection of GM1 ganglioside in liver cryostat sections under various fixation conditions

Comparable GM1 staining intensity and pattern were observed in liver cryostat sections after both formaldehyde and anhydrous acetone fixations (Figure 2). For dry acetone, the effects of fixation temperature and time on



**Figure 3.** Effect of acetone temperature on histochemical detection of GM1 ganglioside in liver cryostat sections. Fixation with (A) 4% formaldehyde for 5 minutes at room temperature (F); (B) cold dry acetone for 2 minutes and (C) 15 min, respectively; (D) dry acetone at room temperature for 2 min and (E) 15 min, respectively. No apparent differences between GM1 staining intensity or in pattern. Rat liver cryostat sections stained with cholera toxin B-subunit. Bar 100  $\mu$ m.

GM1 staining were also examined. Liver sections fixed with dry acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $25^{\circ}\text{C}$ , both for 2 and 15 min, were compared with those fixed with formaldehyde at room temperature for 5 min. No apparent difference in the staining intensity and/or location of the reaction product was observed in corresponding areas of parallel sections (Figure 3). On the contrary, fixation with an acetone-water mixture caused apparent diffusion of the GM1 reaction product (Figure 4).

#### Densitometric analysis of GM1 staining in liver sections

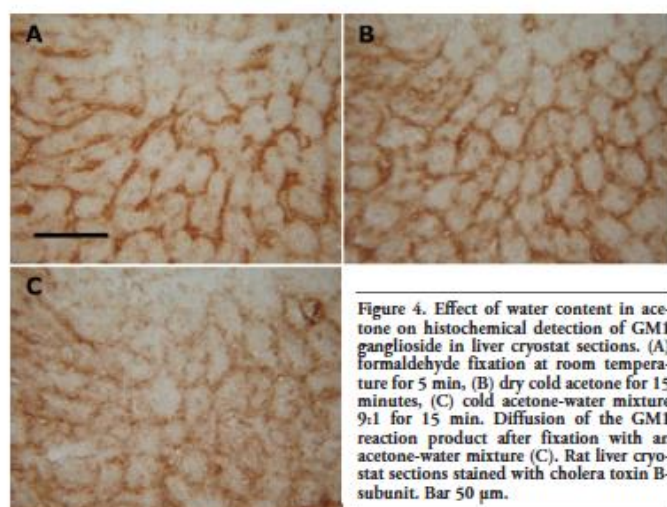
Densitometry was used for evaluation, in order to obtain objective data regarding the optical density of GM1 staining in tissue sections. The differences in the optical density of GM1 staining in liver tissue from 23 normal animals after formaldehyde and anhydrous acetone fixation were not statistically significant (*data not shown*). Finally, neither formaldehyde nor dry acetone fixation caused diffusion of the reaction product in the liver sections.

#### Comparison of histochemical detection of GM1 ganglioside in liver and brain cryostat sections after different fixations

Unlike the liver samples, where formaldehyde and acetone fixations of cryostat sections gave minimal differences, different pretreatment of brain sections led to remarkably different GM1 staining patterns. Cryostat brain sections fixed with formaldehyde (F) displayed a diffuse GM1 staining pattern in the neuropil of cortical and subcortical grey matter, without focal accentuation of the staining (Figure 5 A,C). The slight and diffuse positivity seen in the white matter probably corresponds to myelin. Baker's solution (B) used instead of formaldehyde (F) had no apparent effect on the diffuse character of GM1 staining. After fixation with anhydrous acetone followed by formaldehyde (A+F), overall GM1 staining was less intensive but the staining pattern became much more distinct, revealing the presence of definable subcellular structures (Figure 5B,D). The finely granular GM1 staining changed for coarsely granular with the anhydrous acetone plus Baker's solution (A+B) sequence (*not shown*).

Treatment of brain sections with MCD led to decreased GM1 staining intensity against formaldehyde fixation (Figure 5 G,H). However, the sharp, focally accented staining pattern was less expressed than after acetone (A+F) as demonstrated (Figure 5 H,I).

In the liver, the distinct, finely granular



**Figure 4.** Effect of water content in acetone on histochemical detection of GM1 ganglioside in liver cryostat sections. (A) formaldehyde fixation at room temperature for 5 min, (B) dry cold acetone for 15 minutes, (C) cold acetone-water mixture 9:1 for 15 min. Diffusion of the GM1 reaction product after fixation with an acetone-water mixture (C). Rat liver cryostat sections stained with cholera toxin B-subunit. Bar 50  $\mu$ m.



GM1 staining of hepatocyte membranes at both sinusoidal and canalicular poles did not display any substantial difference in sections fixed either in formaldehyde or in anhydrous acetone (Figure 5 E,F).

## Discussion

In general, there are two major issues regarding the problem of optimal GM1 and ganglioside *in situ* detection: i) reliability of

acetone pre-treatment, which should ensure effective retention of gangliosides *in situ*, in other words acetone pre-treatment should not lead to a significant loss of the lipids; and ii) evaluation of all factors responsible for optimal *in situ* demonstration.

As far as the reliability of acetone pre-treatment is concerned, the quantitative analysis of GM1 ganglioside in extracts of liver sections showed a negligible loss. Likewise, densitometric evaluation of the reaction product of histochemical GM1 detection in liver sections carried out in formaldehyde fixed sections and sections pretreated with acetone did not show statistically significant differences. Loss of gangliosides by acetone extraction of dried liver homogenate at room temperature was negligible ( $3.0 \pm 0.3\%$ ). An increased loss of gangliosides in brain up to  $9.5 \pm 1.1\%$  corresponds to the less intensive GM1 staining in brain cryostat sections.

It might be possible to see an analogy with the conclusions of Ilangumaran and Hoessli,<sup>28</sup> who proposed that in rafts, the GSL-rich core of the microdomains persists depletion of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD), while the cholesterol-rich annulus surrounding the core, containing as well some GM1, seems to be partially released by MCD. It might be that acetone similarly extracts some GM1 from cholesterol-rich areas. Further extensive studies will be necessary to support this hypothesis.

Our study also confirmed the risk of pre-treatment with acetone; extraction must be carried out with anhydrous acetone; this observation was previously described.<sup>14</sup> It should be stressed that anhydrous acetone and dry cryostat sections are both essential for *in situ* preservation of gangliosides. Breaking of any of these conditions leads to ganglioside dislocation *in situ* or directly to their extraction extra *situ*. This might explain the loss of gangliosides described by Schwarz and Futerman,<sup>29</sup> who found an approximate 56% reduction of gangliosides after acetone fixation and a 46% reduction after formaldehyde-acetone fixation of cultivated hippocampal neurons.

Acetone extraction is recommended for better *in situ* detection of gangliosides in many studies.<sup>1,12</sup>

The enhanced staining intensity after acetone pre-treatment is explained by the improvement of permeabilization.<sup>21</sup> Glycosphingolipid globotriaosylceramide was more accessible to verotoxin in kidney sections after acetone pre-treatment; an effect ascribed to the removal of exceeding cholesterol. Similar effects were seen after methyl- $\beta$ -cyclodextrin.<sup>1,22</sup> Schwarz and Futerman<sup>29</sup> also demonstrated brighter labeling of gangliosides in cultivated hippocampal neurons after combined fixation with formaldehyde and acetone, despite significant gangliosides removal dur-

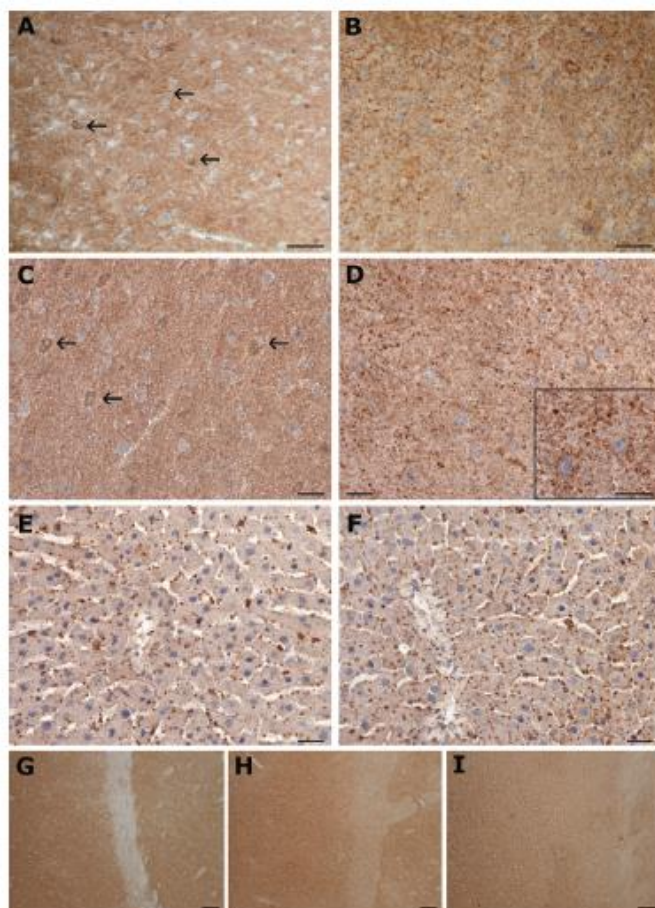


Figure 5. Compared effect of different fixatives on histochemical detection of GM1 ganglioside in rat liver and brain. Cryostat sections stained with cholera toxin B-subunit. (A, B) Brain cortical grey matter; low power field microphotographs. (A) Diffuse positivity in the neuropil after formaldehyde fixation and (B) focally accented staining after anhydrous acetone + formaldehyde (A+F) combination. Bars 50  $\mu$ m. (C, D) Brain cortical grey matter; high power field microphotographs. (C) Diffuse staining in the neuropil after formaldehyde fixation. Note also a migration of unstained myelin lipids forming myelin figures (A,C); some of them are marked by arrows. (D) Granular staining after acetone fixation (A+F) suggesting localization of a reactive product to the cell membranes (for a detail see insert in D). Bars 25  $\mu$ m. (E, F) High power field pictures of the liver sections fixed with (E) formaldehyde or (F) acetone + formaldehyde (A+F). Finely granular staining on the cell membranes of hepatocytes is uninfluenced by the type of fixation. Bars 25  $\mu$ m. Cell nuclei were counterstained with hematoxylin. (G,H,I) survey of brain cortex; pre-treatment of cryostat sections with (G) formaldehyde, (H) MCD + formaldehyde and (I) anhydrous acetone + formaldehyde. Slight gradual (G  $\rightarrow$  I) decrease in overall staining intensity and increase in sharpness and condensation of the staining pattern. Bars 100  $\mu$ m.



ing pre-treatment (see also above).

The finely granular GM1 positivity seen in acetone (A+F) fixed sections could represent the combined effect of unmasking, due to cholesterol extraction and precipitation resulting from the low solubility of GSLs in acetone (difference from MCD). The increased granularity and contrast seen when the combination of anhydrous acetone plus Baker's solution (A+B) was used for fixation, could be explained by the well known aggregation of gangliosides in presence of  $Ca^{2+}$  ions.<sup>2,24</sup>

Our results in brain samples showed better outcomes *in situ* detection of GM1 after acetone pre-extraction of dry cryostat sections (Figure 5A-D) which also inhibited the considerable diffusion of myelin lipids into the mounting medium in acetone unextracted sections.

This suggests that the benefits of acetone, as a process of physical fixation, are related to precipitation of polar lipids generally (inhibition of their local diffusion), and to removal of the possible masking effect of cholesterol.

However, we should be aware that cryostat section technique is inherently influenced by thawing and subsequent drying of the sections that might influence *in situ* localization of polar compounds, including gangliosides. The current study offers the optimal way to cope with this problem.

## Conclusions

We present for the first time evidence that both pre-treatments (formaldehyde and acetone) provide good information on GM1 localization at the light microscopy level in liver sections. In the brain, the quality of GM1 detection was found to be higher in acetone pretreated sections; optimal conditions vary based on the lipid composition of the tissue. The benefits of acetone pre-treatment are linked to the use of anhydrous conditions.

## References

1. Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction differentiation and oncogenesis. In: Kanfer JN and Hakomori S eds. Handbook of Lipid Research. Vol. 3. Sphingolipid Biochemistry. Plenum Press, New York, London 1983, pp. 327-336.
2. Hakomori S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. An Acad Bras Cienc 2004;76:553-72.
3. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology 2007;17:1R-13R.
4. Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: Recollections and future trends. Biochim Biophys Acta 2008;1780:325-46.
5. Holmgren J. Receptors for cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin revisited. Prog Brain Res 1994;101:163-77.
6. Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of Cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxins LTb-I, LHT-IIa, and LHT-IIb. Infect Immun 1988;56:1748-53.
7. MacKenzie CR, Hiramata T, Lee KK, Altman A, Young NM. Quantitative analysis of acetal toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. J Biol Chem 1997;272:5533-8.
8. Kotani M, Kawashima I, Ozawa H, Terashima T, Tai T. Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. Glycobiology 1993;3:137-46.
9. Chen Y, Qin J, Chen ZW. Fluorescence-topographic NSOM directly visualizes peak-valley polarities of GM1/GM3 rafts in cell membrane fluctuations. J Lipid Res 2008;49:2268-75.
10. Schwarz A, Futerman AH. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies. Biochim Biophys Acta 1996;1286:247-67.
11. Schwarz A, Futerman AH. Immunolocalization of gangliosides by light microscopy using anti-ganglioside antibodies. Methods Enzymol 2000;312:179-87.
12. Kotani M, Kawashima I, Ozawa H, Ogura K, Ishizuka I, Terashima T et al. Immunohistochemical localization of minor gangliosides in the rat central nervous system. Glycobiology 1994;4:855-65.
13. Chark D, Nutikka A, Trusevych N, Kuzmina J, Lingwood C. Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosyl ceramide by verotoxins and a monoclonal antibody. Eur J Biochem 2004;271:405-17.
14. Elleder M, Lajda Z. Studies in lipid histochemistry. VI. Problems of extraction with acetone in lipid histochemistry. Histochemie 1971;28:68-87.
15. Schwarz A, Futerman AH. Determination of the localization of gangliosides using anti-ganglioside antibodies: comparison of fixation methods. J Histochem Cytochem 1997;45:611-8.
16. Ledeen RW, Yu RK, Eng LF. Gangliosides of human myelin: sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. J Neurochem 1973;21:829-39.
17. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. Biochim Biophys Acta 1957;24:604-11.
18. Jirkovská M, Majer F, Šmídová J, Striteský J, Šaňk GM, Dráber P et al. Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. Glycoconj J 2007; 24:231-41.
19. Ellerbe P, Meiselman S, Sniegowski LT, Welch MJ, White E. Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. Anal Chem 1989;61:1718-23.
20. Ilangumaran S, Hoessli D. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. Biochem J 1998;335:433-40.
21. Kusunoki S, Chiba A, Hirabayashi Y, Irie F, Kotani M, Kawashima I, et al. Generation of a monoclonal antibody specific for a new class of minor ganglioside antigens, GQ1b alpha and GT1a alpha: its binding to dorsal and lateral horn of human thoracic cord. Brain Res 1993;623:83-8.
22. Khan F, Proulx F, Lingwood CA. Detergent-resistant globotriaosyl ceramide may devolve verotoxin/glomeruli-restricted hemolytic uremic syndrome pathology. Kidney Int 2009;75:1209-16.
23. Sharom FJ, Grant CW. Glycosphingolipids in membrane architecture. J Supramol Struct 1977;6:249-58.
24. Sharom FJ, Grant CW. A model for ganglioside behaviour in cell membranes. Biochim Biophys Acta 1978;507:280-93.

## 8.2. Příloha 2

Šmíd F, Ledvinová J, Petr T, Šmídová J, Vítek L. Methods Based on Binding Affinity of the B-Subunit of Cholera Toxin to Gangliosides in Biochemistry and Histology (kapitola v knize Cholera: Symptoms, Diagnosis and Treatment, Editor: Evelyn L. Melbourne, ISBN: 978-1-61761-789-8, © 2010 Nova Science Publishers, Inc.)

Chapter 4

---

## Methods Based on Binding Affinity of the B-Subunit of Cholera Toxin to Gangliosides in Biochemistry and Histology

---

*František Šmíd<sup>1\*</sup>, Jana Ledvinová<sup>2</sup>, Tomáš Petr<sup>1</sup>,  
Jaroslava Šmídová<sup>3</sup> and Libor Víteček<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Histology and Embryology, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup><sup>th</sup> Department of Internal Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

### Abstract

Cholera toxin is a heat labile enterotoxin produced by *Vibrio cholerae*. The toxin consists of an A-subunit (with enzymatic activity) and B-subunit (CTB) which have very high binding capacities to ganglioside GM1(Galβ1-3GalNAcβ 1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1Cer); the main receptor molecule on the surface of the target cells in a cholera infection (*e.g.* epithelial cells of the small intestine). Several other cross-reactive gangliosides have been described as CTB receptors (*e.g.* GD1b ganglioside); however, their affinity is low, and therefore high concentration of receptor ganglioside is necessary. Additionally, other CTB-reactive gangliosides, *e.g.* Fucosyl GM1 ganglioside (Fuc-

---

\* Corresponding author: Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Bojišti 3, 128 08 Prague 2, Czech Republic., E-mail: smid@cesnet.cz

GM1), are usually present in negligible amounts in the tissues; however, producing very little contribution towards the reaction.

The binding affinity of CTB to GM1 is used for the detection of GM1 or the other ganglioside-type gangliosides, produced by *Clostridium perfringens* neuraminidase treatment via the following methods: (a) the ELISA assay, with gangliosides adsorbed by the ceramide portion of the polystyrene microwells, and (b) TLC overlay methods, with or without pre-treatment with neuraminidase. Fluorochrome labeled CTB targeting of GM1 is widely used in the analyses of raft lipids using ELISA, TLC overlay, and flow cytometry.

The subcellular distribution of GM1, as a representative of the ganglioside family, can be done similarly; however, its binding affinity in histochemical or cytological applications is not strictly specific for GM1 and thus some cross-reactive gangliosides (e.g. GD1b) can cause additional staining. Therefore, for critical analysis, TLC is recommended as a complementary step for *in situ* detection of cells or tissue sections.

In our laboratory, CTB detection was applied, in order to study the changes of the content and localization of GM1 ganglioside in both normal and cholestatic rat liver. In normal rat liver, GM1 was localized in the canalicular and sinusoidal hepatocyte membranes, in both the peripheral and intermediate zones of the hepatic lobules; it was nearly absent in the central zone. In rats with cholestasis, induced by 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, GM1 was also expressed in the central lobular zone, and a shift of GM1 staining from intracellular to sinusoidal localization was observed. These changes were correlated with the concentration of serum bile acid. The GM1 content together with the GM1-synthase mRNA expression remained unchanged. The redistribution of GM1 into the sinusoidal membrane in a situation of limited biosynthesis could be responsible for the protection of hepatocyte membranes against the strong detergent effects of bile acids, accumulated during cholestasis.

## Introduction

Gangliosides are complex glycosphingolipids (GSL) with a strong amphiphilic characteristic; the molecules having a hydrophilic sialic acid-containing carbohydrate chain and a double tailed hydrophobic moiety, called ceramide (Figure 1) [1]. The structures of GSL used in this chapter are listed in Figure 2 together with Svennerholm's nomenclature [2, 3] and the IUPAC-IUB nomenclature [4].

Gangliosides are expressed ubiquitously in all eukaryotic cells, in which they are mainly localized in the outer leaflet of the cell membrane, and are particularly abundant in the plasma membranes of neurons. Their membrane localization is connected to two basic functions:

First, they serve as receptors for bacterial toxins, bacteria, viruses [5], plus some other bioactive molecules, tumor markers, mediators in cell-cell recognition and adhesion, as well as modulators for signal transduction [6].

Second, gangliosides and other (glyco)sphingolipids (GSL) protect cells against harmful factors in their environment by forming a mechanically stable and chemically resistant outer leaflet of the lipid bilayer. This is accomplished by their rigid structure, with a much higher melting point, when compared with the glycerophospholipids [7]. The rigidity of glycosphingolipid molecule is done by intramolecular interactions; stabilizing the structure in the oligosaccharide, as well as in the ceramide. The ceramide portion has a rigid conformation, with two closely packed usually saturated alkyl chains [8, 9, 1]. The oligosaccharide portion is stabilized by sialic acid [10], as well as by other factors such as

$\text{Ca}^{2+}$  ions [11]; all reviewed by Tettamanti *et al.* [12]. Complex GSLs are supposed to self-aggregate, to form less-liquid sphingolipid/cholesterol-based plasma membrane microdomains (also called “lipid rafts”), which segregate the protein receptors and provide a mechanism for the compartmentalization of the signaling components in the plasma membrane; concentrating certain components in the lipid rafts and excluding others [13].

Cholera toxin is a heat labile enterotoxin produced by *Vibrio cholerae*. The toxin consists of an A-subunit (with enzymatic activity) plus a B-subunit, having a binding capacity to the receptor molecules on the surfaces of target cells (*e.g.* epithelial cells of the small intestine). The original observations of van Heyningen *et al.* [14], that a crude ganglioside mixture could inactivate cholera toxin, led to the recognition of specific reaction with single ganglioside GM1 by Holmgren *et al.* [15]. Similar results were described by Cuatrecasas [16], as well as King and van Heyningen [17].

The affinity of CTB for GM1 is remarkably high; the dissociation constant ( $K_D$ ) was determined by the surface plasmon resonance, and have been estimated to be in the range from  $4.6 \times 10^{-12}$  [18] to  $7.3 \times 10^{-10}$  [19]. Because of its high affinity, CTB is widely used for the detection of GM1 ganglioside in biochemical and cell biology studies, instead of using anti-GM1 antibodies.

## 1. Methods Used in Biochemical Studies: Quantification of CTB Binding

The methods are based upon the evaluation of CTB (or other toxins, in general) in different dilutions, being bound to constant amounts of purified or TLC-separated glycosphingolipids.

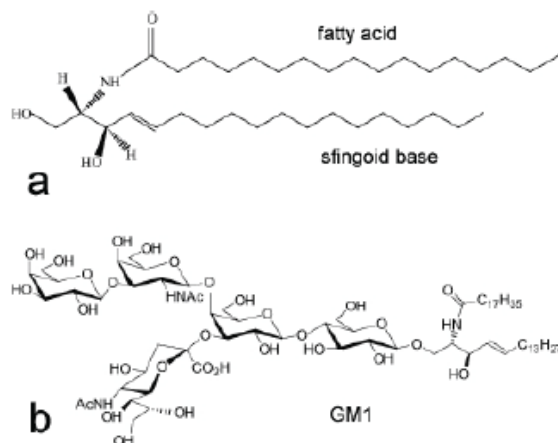


Figure 1. Structure of ceramide and GM1 ganglioside

Symbols of Svennerholm:	Structures of glycosphingolipids:
LacCer	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$
AsialoGM1	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$
GM1	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2$
GM2	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2$
GD2	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{NeuAc}\alpha 2$
GD1a	$\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2$
GD1b	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{NeuAc}\alpha 2$
GT1b	$\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{NeuAc}\alpha 2$
GQ1b	$\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1 \text{Cer}$ $\downarrow$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{NeuAc}\alpha 2$
<p>Ganglioside symbols, according to Svennerholm (1963; 1994), with IUPAC-IUB (1977) nomenclature in parentheses: GM3 - (II<sup>3</sup>NeuAc-LacCer); GM2 - (II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>4</sub>Cer); GM1 - (II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>4</sub>Cer); GD3 - (II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-Lac-Cer); GD2 - (II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer); GD1a - (IV<sup>3</sup>NeuAc,II<sup>3</sup>NeuAcGgOse<sub>4</sub>Cer); GD1b - (II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer); GT1b - (IV<sup>3</sup>NeuAc,II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer); GQ1b - (IV<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>,II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer).</p>	

Figure 2. Structures of GSL together with Svennerholm's nomenclature [2, 3] and the IUPAC-IUB nomenclature [4]

### 1.1. Immunoassays Based on Absorption of Gangliosides on a Polystyrene Surface

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), described by Engvall and Perlmann in 1972 [20] was early adapted to cholera serology by Holmgren and Svennerholm [21].



The method is based on the spontaneous adsorption of the amphipathic gangliosides onto plastic surfaces via their ceramide moiety; leaving the oligosaccharide portion free to react with specific ligands. Separation of the bound from the free ligand, and from untreated materials, is done by a simple washing. After that, the bound ligand can be detected by immunological techniques.

The original procedure consisted of several sequential steps: (1) binding of the cholera toxin to the GM1 gangliosides; (2) binding of the rabbit anti-CTB antibody to CTB; (3) reaction with secondary anti-rabbit IgG antibody coupled with alkaline phosphatase; and (4) producing a color reaction with nitrophenylphosphate, a substrate of alkaline phosphatase. The color change is measured spectrophotometrically, resulting from the amount of bound ligand. The sensitivity of the method is high, 10 pmoles (100 pg) of cholera toxin (corresponding to about  $10^9$  bound GM1 molecules). The ganglioside ELISA also works well with the tetanus toxin system [22], in which the strongest reaction is obtained with the GT1b, GQ1b, and GD1b gangliosides. The ganglioside-ligand reaction is a versatile procedure applicable to different ligands, either purified or crude (*e.g.* cholera toxin); and to polyvalent, instead of monospecific, antiserum.

## 1.2. CTB Binding Affinity and Specificity for Gangliosides Determined by Surface Plasmon Resonance

The rapid immobilization of glycoconjugates on solid surfaces (such as polystyrene microplate or TLC layer) is not an ideal way of presenting them in their natural form. In recent years, the rapid expansion of the application of surface plasmon resonance (SPR) to a wide range of biomolecular interactions has been noted. For protein-carbohydrate interactions, SPR techniques offer a means of presenting glycolipids in an environment that closely resembles their situation *in vivo*. SPR methods are techniques in which the proteins' binding to glycolipids is captured in artificial membranes, and then is evaluated. Liposomes incorporating glycolipids are captured on or fused to BIACORE sensor chip surfaces, and the binding analytes, such as bacterial toxins or antibodies to oligosaccharide ligands (presented on the membrane surfaces) can be characterized. Glycolipid presentation in a membrane environment overcomes the problems associated with the conventional assays. Additionally, monitoring interactions by surface plasmon resonance avoids the requirements for a labeled ligand or analyte, and provides data from which the rate and affinity constants can be derived [23, 24].

The SPR technique was used for CTB binding to gangliosides by Kuziemko *et al.* [18] and by MacKenzie *et al.* [19]. The Kuziemko's method showed the strongest binding to GM1; however, the ganglioside-CTB affinity order of GM1 > GM2 > GD1a > GM3 > GT1b > GD1b > asialoGM1 is not in agreement with the results obtained by other methods, nor with those predicted according to the crystal structure of the CTB-GM1 complex.

MacKenzie *et al.* developed a method of glycolipid incorporation into artificial liposomes, containing a small amount of lipopolysaccharide; allowing the capture of the liposome on the SPR sensor chip surface, via immobilized anti-lipopolysaccharide antibody. This improved liposome technique provides a more restricted range of oligosaccharide structures for toxin binding. As expected, the highest affinity for CTB corresponds to GM1

ganglioside, with approximately a 10-fold lower affinity found for GD1b. The affinities of all of the other gangliosides were negligible [19].

One possible explanation of the differences between the above-mentioned SPR techniques might be from their different compositions, as well as the preparation of the liposome-chip complex; therefore resulting in the presentation of different oligosaccharide structures to the CTB [19].

### 1.3. Quantification of GM1 Ganglioside, or Gangliotetraose Gangliosides, Bound to a Consistent Amount of CTB

Conversely, the methods of toxin-ganglioside binding were used for the quantification of GM1 ganglioside or gangliotetraose gangliosides to a consistent amount of CTB [25, 26].

#### 1.3.1. Quantification of GM1 ganglioside or gangliotetraose gangliosides using the CTB-ELISA assay

Wu and Ledeen [25] elaborated the CTB binding assay as follows: individual gangliosides (GM1, GD1a, GD1b, and GT1b) and a mixture of bovine brain gangliosides (BBG) are dissolved in 95% ethanol-water (1:1 v/v), and then diluted with the same solvent to concentrations ranging from 0.5 to 3.0 pmol/50  $\mu$ l (the average MW of the disialogangliosides was assumed for BBG). Adsorption of the gangliosides onto plastic microwells was carried out according to that described by Blackburn *et al.* [27]. Aliquots of 50  $\mu$ l were added to each microwell, and then the uncovered wells were placed in a small closed plastic box for 100 min. The adsorption of the gangliosides onto the plastic microwells was stopped before the meniscus of the slowly evaporating solution could contact the well bottom. The termination was effected by the addition of 100 - 200  $\mu$ l of cold 50 mM PBS, pH=7.4, and finally by the removal of the fluid. The wells were rinsed three times with PBS containing 2% BSA at 37°C for 1 h. After removal of the later, the wells were first incubated with 100  $\mu$ l of neuraminidase (*Clostridium perfringens*, type V) and 0.04 units in sodium acetate buffer (50mM, pH 5.2) for 2 h at 37°C, then with Cholera toxin B-subunit horse radish peroxidase labeled (CTB-HRP from List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) at 37°C for 1 h. The cholera toxin solution consisted of 40 ng of CTB-HRP in 2% BSA-PBS. After such treatment, the wells were rinsed at least three times with PBS containing 0.1% Tween 20 (v/v). Finally, each well received 100  $\mu$ l from a Bio-Rad substrate kit of horseradish peroxidase (2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline], plus hydrogen peroxide). Color development progressed over the next 30 min., at room temperature, and was then quantified at 405 nm with a Bio-Rad EIA reader (Model 2550). An optical density of approximately 0.50 - 0.53 per picomole above that of the blank was obtained for each ganglioside; the blank values being between 0.10 and 0.13. The analysis of GM1 in a given mixture was carried out with the absence of enzyme treatment.

Calibration curves of virtually identical shapes were generated for each individual ganglioside after neuraminidase treatment (Figure 3). The calibration curve, without neuraminidase, gave curves with a much lesser slope for gangliosides GD1b and GD1a.



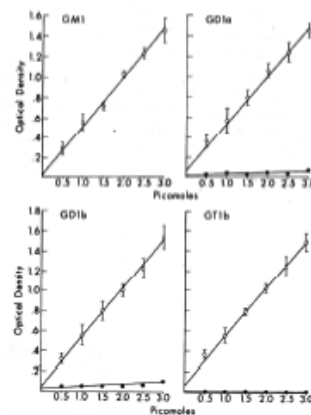


Figure 3. Binding of CTB-HRP (40ng) to variable amounts of individual gangliosides GM1, GD1a, GD1b, and GT1b; with (○) and without (●) neuraminidase. Error bars indicate the SD (Reproduced, with permission, from Wu and Ledeen [25])

### 1.3.2. Quantification of ganglioside GM1 and gangliotetraose gangliosides using CTB - TLC overlay

The method of the TLC overlay with CTB was described for the detection and quantification of GM1 ganglioside [25]; with the weak binding of GD1b, and possibly even of GD1a, being observable as well. Similarly, gangliotetraose gangliosides can be detected after separation on TLC, and then subsequently treated on the plate with neuraminidase from either *Clostridium perfringens* or *Vibrio cholerae*. These two neuraminidases convert the gangliotetraose gangliosides GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, and GT1a to GM1a, prior to the CTB overlay. They can split the sialic acid residues from oligo- and polysialylgangliosides in the terminal position; however, they never cleave the sialic acid from the internal galactose in GM1 [28].

Additionally, fucosylated gangliosides can be converted to GM1 by fucosidase treatment [25]. When fucosidase is used, it is added immediately after neuraminidase: 600 μunits/100μl, in 50 mM PBS (pH = 6.95) is placed in each well for 3 h at 37°C, then washed out with PBS/Tween 20 and treated with B-HRP, as above.

This procedure is very useful for the sensitive detection and verification of the gangliotetraose family, as can be inferred from their positions on the chromatogram and from the fact that they bound the CTB after neuraminidase treatment.

### Description of the procedure, according to Wu and Ledeen [25]

A ganglioside mixture from neuro-2A cells, containing approximately 0.05 μg of N-acetylneuraminic acid (NeuAc), is applied to a 10 x 10 cm aluminum-backed Merck silica gel 60 HPTLC sheet (EM Science, Cherry Hill, NJ, USA). The TLC is developed in chloroform - methanol - 0.25% KCl (5:4:1). The dried plate is trimmed to fit into a 5 cm Petri dish, and treated for 30 s with a solution of 0.2% polyisobutylmethacrylate in hexane. The TLC sheets

are air-dried, soaked for 1 h in acetate or Tris buffer, and then either treated directly with labeled CTB-horse radish peroxidase (CTB-HRP), or first reacted with neuraminidase. For the latter method, the plate is covered for 2 h with 5 ml of the above neuraminidase solution (1 unit), while covered with parafilm. The neuraminidase is removed and the plate covered with 5 ml of freshly prepared PBS solution, containing CTB-HRP (4 µg of CTB-HRP) plus 1% BSA for 1 h. It is agitated slowly on a roller shaker. The excess solution is discarded, and the plate is rinsed thoroughly with deionized water, and then treated with an excess of 4-chloro-1-naphthol solution (10 mg dissolved in 3 ml of methanol, before the addition of 15 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer [pH=7.5], and 5 µl of 30% hydrogen peroxide). It is kept covered in the dark for half an hour and then rinsed thoroughly with water. All incubations and washing operations are carried out in 5 cm Petri dishes.

The authors demonstrated the high specificity of the binding to GM1 in the ELISA assay [25]; while GD1b displayed low, but measurable, binding (Figure 3). Although in quantitatively negligible amounts, when compared to GM1, GD1b can be detectable with use of the TLC overlay (Figure 4) [29].

A two-step TLC overlay, with biotin labeled-CTB (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) followed by an ABC/HRP kit (DakoCytomation, Denmark; 60 min at RT) was used in our laboratory (Figure 5). In further experiments, we found that replacement of the ABC kit with Streptavidin-peroxidase polymer Ultrasensitive (Sigma, St. Louis MO, USA) greatly enhanced (by about 50 times) the sensitivity of the staining [29]. The BBGs were detected by this staining method, both with and without neuraminidase pre-treatment. The optimal concentrations of lipid neuraminic acid seem to be 35.5 ng of GM1 or 185.4 ng of BBG (Figure 5, lines c and d).

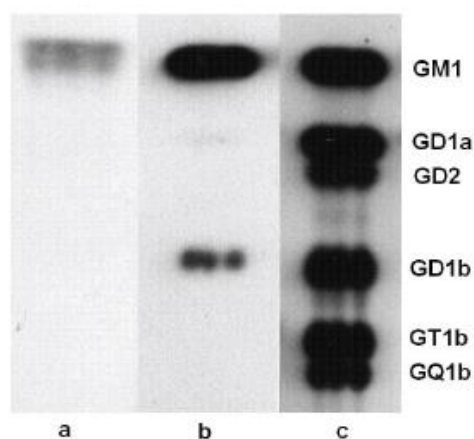


Figure 4. TLC overlay with biotin labeled-CTB, followed by ABC kit; Lane a = GM1 standard; line b and c = mouse brain gangliosides; the TLC was developed as described above. Lane c was with neuraminidase pre-treatment but lines a and b were not [29]

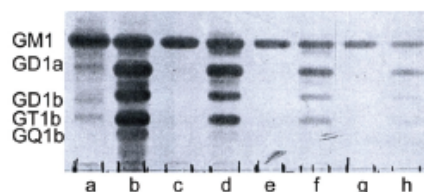


Figure 5. TLC overlay with biotin labeled-CTB, followed by ABC kit; lines a, c, e, and g were without neuraminidase pre-treatment, and lines b, d, f, and h were with neuraminidase pre-treatment. The BBG applied on the TLC corresponds to: a = 355 ng; b = 1854 ng; c = 35 ng; d = 185.4 ng; e = 17.8 ng; f = 37ng; g = 3.6 ng; h = 18.5 ng of lipid neuraminic acid. Depending on the total amount and concentration applied on the TLC, also the other gangliosides GD1a, and GD1b, GT1b can be shown with a high concentration of BBG, including in samples without neuraminidase treatment (sample a) [29]

## 2. Methods for Histochemical and Cell Biological Studies

Specific CTB-GM1 ganglioside binding is widely used for GM1 detection in cells and tissues, instead of anti-GM1 antibody; especially for the localization of GM1 in plasma membrane rafts. One advantage of this detection method is in its simplicity, which also enables studies of subcellular problems, impossible to realize by biochemical methods; CTB is also more commercially accessible than are antibodies against GM1. One disadvantage can be in possible weak cross-reactivity with some gangliosides, or rarely with other substances.

### 2.1. Is the Cross-Reactivity of Other Gangliosides the Limiting Factor in Histochemical, Cell Biological, and Flow-Cytometric Detections?

The affinity of CTB to the other gangliosides is much weaker than it is to GM1. This fact has been reported and discussed in several papers, but published results sometimes differ according to the assay which is used for the evaluation.

The results obtained using the ELISA and neutralization methods show that the relative concentrations of GM2, GM3, GM1 (GlcNAc), GD1b, GT1b, and GA1 gangliosides must be more than 1000 times higher (in case of GD1a, 300 to 1000 times higher) in order to get a comparable effect to GM1 [30]. For ganglioside GD1b, a 50 times weaker reaction on the TLC overlay was estimated, compared to that with GM1 [31]. By use of the surface plasmon resonance technique, a 10 times lower binding of GD1b was found [19].

Maserini *et al.* [32] found the ability of Fuc-GM1 ganglioside to mimic the receptor function of GM1 for cholera toxin (CT). For this purpose, cultured rat glioma C6 cells were enriched with Fuc-GM1, and the responsiveness to CT was compared with that of cells enriched with GM1 ganglioside. High-sensitivity isothermal titration calorimetry experiments showed that the association constants of CT with either Fuc-GM1 or with GM1 ganglioside were comparable ( $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  and  $1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , respectively, at  $25^\circ\text{C}$ ). Furthermore, the

association constants of the B-subunit pentamer with Fuc-GM1 or GM1 ganglioside were comparable (about  $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  and  $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , respectively, at  $25^\circ\text{C}$ ).<sup>i</sup>

A very rare case was described of high CTB reactivity of mouse embryonic neuroendothelial cells, with barely chromatographically detectable GM1 [33]. The authors of the paper did not give any clear conclusion as to the cross-reactive molecule. The only recommendation was that the utilization of CTB alone would be inconclusive, and that the TLC analysis of gangliosides ought to be performed in advance, in order to avoid an overestimation of GM1 expression and/or the mischaracterization of the GM1 ganglioside species.

Blank *et al* described the specific binding of FITC-labeled CTB to GM1; except that there was probably also a nonspecific binding to the glycosylated proteins, as well as a nonspecific binding of the FITC to the cell surface [34]. Contrary to this, Parton [35] demonstrated that the only components capable to bind to the CTBs are the glycolipids, not the glycoproteins.

Despite the problems of cross reactivity, CTB binding to GM1 is widely used in both histology and cell biology.

There are two types of situations that must be considered in the application of CTB-GM1 binding.

1. When GM1 is used as a representative of the gangliosides (GSL) that are abundantly present in cells. In this case, there is no need to distinguish other gangliosides (*e.g.* GM1 is the GSL representative in the lipid rafts).
2. When GM1 is analyzed in tissues, using CTB, some other cross-reactive gangliosides (or rarely other substances) might be visualized. Therefore, TLC analysis of the gangliosides in studied tissue should be performed in advance, in order to document the prevalence of GM1 over the other gangliosides. The cross-reactivity of non-lipid substances should be checked in parallel sections, and pre-extracted with mixtures of chloroform - methanol - water.

The practical applications of CTB-GM1 binding in cell biology and histology is demonstrated in the next few paragraphs.

## 2.2. Methods of Analysis of Lipid Rafts

The binding of CTB to GM1 is widely used in the analysis of membrane microdomains ("lipid rafts"), which are fragments prepared from the plasma membrane, usually by solubilization with non-ionic detergents. Because of their high-lipid content, they float in the low density fraction during gradient ultracentrifugation. A variety of detergents have been used, and detergent-free separation has also been developed [13].

The lipid rafts, extracted from the plasma membrane, can be identified by Western blot analysis, based on several markers, of which GM1 ganglioside is the most common.

Plasma membrane fractions, isolated by gradient ultracentrifugation, are separated by polyacrylamide electrophoresis, then transferred on nitrocellulose (NC) or a PVDF

membrane, and blocked with 3% BSA in PBS. The GM1 band is detected by CTB-HRP, followed by the detection of the HRP using chemiluminiscent substrates [36].

Alternatively, the membrane fractions from ultracentrifugation are loaded on NC or PVDF membranes as dots, dried, blocked with 3% BSA, and then detected with CTB-HRP. The amount of GM1 is quantified by scanning of the band or dot intensity [36, 37]. The Western blot methods are useful for the identification and semi-quantification of the raft amounts.

The identification and quantification of GM1 in the separated fractions can be done by an indirect ELISA protocol, according to Thomas *et al.* [37], on PolySorp star well plates (Nunc, Denmark). This ELISA method showed a 1000-fold greater sensitivity than did the dot blot or the Western blot analyses.

#### 2.2.1. Analysis of lipid rafts using microscopy

Fluorescence microscopy was applied for the monitoring of GM1 in the plasma membrane from various cells, using a CTB-specific ligand coupled either to a fluorescent dye [38-40], or using a secondary conjugated antibody dye. Simultaneously, confocal laser scanning microscopy can be used for the visualization of lipid rafts on the T-cell membrane. Non-stimulated and stimulated T-cells were treated with CTB-biotin conjugate. After washing and blocking, the cell pellet was incubated with streptavidin-FITC [41].

The distribution of GM1 has been investigated by freeze-etch electron microscopy in the phosphatidylcholine bilayer, after visualization with CTB-ferritin labeled [41].

#### 2.2.2. Flow-Cytometry methods

A fluorescent activated cell sorter (FACS) was used to study leukemic cells. The GM1 ganglioside binding sites for CTB were found to be normally expressed in chronic leukaemias, but greatly diminished (or absent) in acute leukaemias [42]. FACS analysis with CTB-FITC was also used for the study of lipid raft distribution in murine T-cell precursors, at various stages of thymic development [43].

A strategy for the identification of non-covalent associations between GM1 ganglioside and various protein receptors was developed by Thomas *et al.* [43]. In principle, the plasma membrane domains were first separated by sucrose gradient centrifugation. Next, the GM1-positive fractions were separated by size-exclusion FPLC, under native conditions in 17 to 20 fractions, and each fraction was analyzed by Western blot under native conditions for the co-elution of GM1 with membrane proteins. Furthermore, the nature of the protein receptors (both interacting and non-interacting) with GM1 was revealed using the Western blot; with the use of duplicate gels transferred on a PVDF membrane, and then probed with specific antibodies.

### 3. An Example of Histochemical Application: Changes in the GM1 Ganglioside Content and Localization in Cholestatic Rat Liver

Our first study was focused on the ganglioside composition in the livers of rats with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE)-induced cholestasis [44].

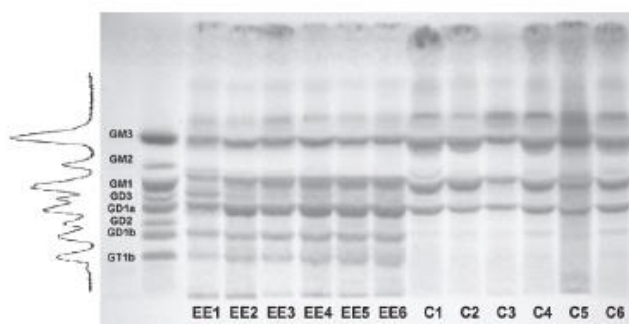


The EE was administered subcutaneously to animals for 18 days (5 mg/kg b.wt.). Cholestasis was monitored by the serum bile acids and bilirubin. When compared to the controls, the EE administration resulted in severe cholestasis, documented by the increase in the serum bile acids ( $39.0 \pm 27.2$  vs.  $589.4 \pm 203.6$   $\mu$ M,  $p=0.002$ ) and in the bilirubin ( $2.1 \pm 0.3$  vs.  $26.0 \pm 18.6$   $\mu$ M,  $p=0.002$ ).

For investigation of the gangliosides, lipid extracts were prepared from the liver tissues of both the control and cholestatic animals, and the ganglioside fraction was isolated as described by Folch *et al* [45] and Suzuki [46]. The total lipid sialic acid contents in the control and cholestatic animals were  $44.3 \pm 15.2$  and  $79.1 \pm 9.0$  nmol/g of liver tissue, respectively ( $p < 0.01$ ). Isolated gangliosides were separated by TLC, then detected with resorcinol-HCl reagent, and evaluated by densitometry (Figure 6) [47].

Control Wistar rats demonstrated the predominance of gangliosides of the a-branch of biosynthesis; while in the EE-treated rats, a significant increase was found of the ganglioside GD1a ( $3.6 \pm 1.0$  vs.  $11.8 \pm 3.0$  nmoles/g,  $p=0.001$ ), as well as the b-series gangliosides GD3 ( $0.08 \pm 0.03$  vs.  $2.0 \pm 1.2$  nmoles/g,  $p=0.002$ ), GD1b ( $0.1 \pm 0.06$  vs.  $5.4 \pm 1.6$  nmoles/g,  $p=0.002$ ), and GT1b ( $0.06 \pm 0.03$  vs.  $6.4 \pm 2.6$  nmoles/g,  $p=0.002$ ). This study represents the first report on changes of the ganglioside pattern in rat livers in EE-induced cholestasis, an experimental model for the cholestasis of pregnancy.

The next step of the study was focused on the ganglioside patterns in the canalicular (apical) and sinusoidal-basolateral membranes of liver cells.



All ganglioside samples were applied in the amount corresponding to 0,225 g of liver tissue on HPTLC plate of silica gel, separated in solvent system chloroform-methanol-0,2% aqueous  $\text{CaCl}_2$ , 55:45:10, v/v/v, detected with resorcinol-HCl reagent and scanned using a TLC Scanner II, CAMAG (Muttens, Switzerland). The densitometric trace of standards is shown at a left part of this figure. (b) Scheme of the *de novo* biosynthesis of oligosaccharide part of gangliosides. Abbreviations of enzymes catalyzing indicated reactions are as follows: SAT I, II and III, sialyl(NeuAc)-transferase I, II and III; GalTII, galactosyl(Gal)-transferase; GalNAcT, N-acetylgalactosaminyl(GalNAc)-transferase; SAT IV, V, and X, sialyl(NeuAc)-transferase IV, V and X.

Figure 6 (a) Marked increase of b-pathway gangliosides GD3, GD1b and GT1b isolated from cholestasis (EE1-EE6) and control (C1-C6) rat livers. Branch-a is expressed in normal Wistar strain of rats with high prevalence. Branch 0 and c are only minor in mammals

Different approaches can be used to study GSL in cholestatic liver membranes. The typical biochemical approach is GSL analysis in membranes isolated by gradient ultracentrifugation; however, it is difficult to obtain canalicular and basolateral membrane fractions in sufficient quantities and purity. Moreover, we found on sections from the control and cholestatic animals that the alkaline phosphatase (ALP), a marker of the purity of the canalicular membrane, migrates from the canalicular into the lateral membrane at cholestasis. The shift of the ALP localization at cholestasis makes ALP an unreliable marker for the purity of the canalicular fraction.

Due to the problems mentioned above in the isolation of membranes by ultracentrifugation, a histochemical investigation, based on the binding of CTB to GM1 was used in our study [48].

The experiment was organized in a similar fashion to the previous study [44]. In brief: liver samples from rats with cholestasis induced by subcutaneous injections of EE at the dose of 5mg/kg b.wt., dissolved in 0.2 ml of 1,2-propanediol (PD), were applied daily for 18 days. The control group consisted of rats given an application of 1,2-propanediol (0.2 ml applied daily for 18 days), and a subgroup without any treatment. After anesthesia, pieces of the liver were collected for a quantitative histochemical analysis, using a systematic uniform random sampling method; they were then rapidly frozen.

### 3.1. Procedure of CTB-GM1 Histochemistry [48]

Frozen sections cut to a thickness of 6  $\mu\text{m}$  were first fixed in dry cold acetone ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) for 2 min, and then in 4% freshly prepared paraformaldehyde for 20 min. Endogenous peroxidase activity was blocked using 0.1% sodium azide dissolved in 1% hydrogen peroxide in PBS for 15 min.

For the blocking of endogenous biotin, a blocking kit (DakoCytomation, Denmark) was used. In order to block the nonspecific binding, the sections were treated with 3% BSA in PBS for 15 min. Cholera toxin was used for the detection of the GM1 ganglioside. Sections were incubated with the CTB-biotin labeled (List Biological Laboratories, USA) diluted 1:250 in PBS plus 3% BSA at room temperature for 60 min. After washing in PBS, the sections were labeled with Streptavidin-peroxidase polymer Ultrasensitive (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:400 in PBS containing 0.05% Tween 20 at room temperature for 60 min. The visualization of peroxidase activity was performed with diaminobenzidine. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin for photographic documentation, but for image analysis the counterstaining was omitted.

Two control experiments were included for each reaction. First, fixed sections were extracted with the chloroform - methanol mixture (2:1), at room temperature for 30 min, followed by histochemical staining. Second, in the negative control experiments, the CTB was omitted. Both of these controls were negative [48].

### 3.2. Results from Experimental Cholestasis Based on GM1 Analysis

Our findings in normal rat liver tissue showed that GM1 was localized in the sinusoidal and canalicular hepatocyte membranes, in both the peripheral and intermediate zones of the hepatic lobules, and it was nearly absent in the central zones. However, in the EE-treated animals, GM1 was additionally expressed in the central lobular zones as well (Figure 7).

The densitometric measurement of the optical brightness in the separate lobular zones, and linear regression analysis, give evidence of the dependence of the amount of GM1 ganglioside in lobular zone III on the TBA serum levels. The interpretation of these findings is connected with lobular blood flow. As blood flows in the liver sinusoids from the periphery to the center of the lobule, numerous substances including bile acids are eliminated by the hepatocytes [48].

Increased differences of GM1 expression between the sinusoidal surface areas and areas of adjacent cytoplasm were found in the EE-treated animals, when compared with PD and untreated animals, by a stratified random sampling selection method (Figure 8). The decreased staining of GM1 in the cytoplasm, and increased redistribution onto the sinusoidal surface are shown in Figure 9 a-c. The increase in the sinusoidal/cytoplasmic ratio of GM1 staining correlated with the increase in serum bile acids, as documented by the linear regression analyses (Figure 9 d-e).

As the GM1 content, as well as the mRNA corresponding to the GM1-synthase, remained unchanged in the livers, the enhanced expression of GM1 at the sinusoidal membrane seems to be caused by the re-distribution of cellular GM1 at unchanged rate of biosynthesis. This could be responsible for the protection of hepatocytes against the harmful effects of bile acids accumulated during cholestasis.

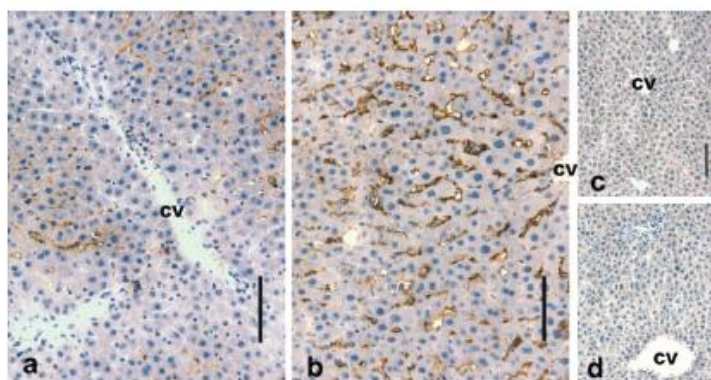


Figure 7. Histochemical localization of GM1 ganglioside in rat liver: (a) In the control liver, the reaction product occurs in lobular zones I and II, and is nearly or completely absent around the central vein in lobular zone III. (b) In the EE-treated liver, the reaction product occurs on the sinusoidal surface from the portal area up to the central vein. CV = central vein, bars = 500  $\mu$ m. Control experiments: (c) CTB was omitted (d) gangliosides were extracted before incubation; counterstained with hematoxylin



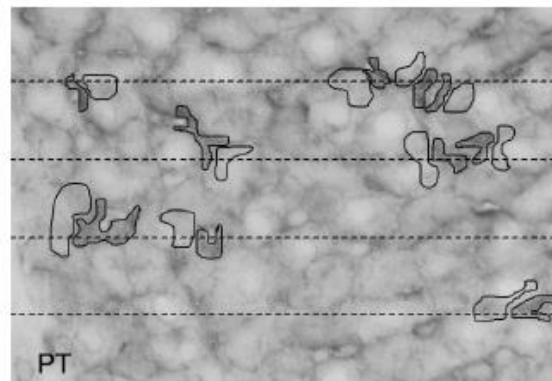


Figure 8. The selection of liver samples and of areas for densitometric image analysis in rat liver sections. Experimental design: 10 animals from EE-treated, 8 animals from PD, and 6 animals from the control group were used. Six liver specimens were taken from each animal. One section from each specimen was used for GM1 detection. On each section, four hepatic lobules, with a clearly discernible central vein, were selected. In each lobule, one measuring frame in the peripheral lobular zone I plus one measuring frame in the corresponding central lobular zone III were selected for analysis. In each frame, 15 areas of the sinusoidal surface and 15 areas of the adjacent hepatocyte cytoplasm were selected by a stratified random sampling method [49], and then marked out. The reaction product was quantified as the mean optical density of the analyzed areas, determined by the CUE 2 densitometric program (Olympus) at high objective magnification 40x (NA = 0.7)

It is obvious, that the histochemical approach, using the detection of CTB-GM1, can solve problems which are not solvable in the cell culture experiments.

The membrane of polarized epithelial cells consists of functionally different apical and basolateral domains, displaying specific protein and lipid compositions. In cell culture, these proteins and lipids are sorted in the trans-Golgi network, and then directly transported to the apical membrane [50, 51, 52]. The situation *in vivo* can be very different. Hepatocytes are in contact with the bile and blood circulation, and in EE induced cholestasis a high concentration of the bile acids might solubilize the lipid bilayer. In this situation, with their rigidity, gangliosides may have a protective role.

In this connection, it should be noted that more than two decades ago a decreased membrane fluidity (*i.e.* increased membrane rigidity) had been described with cholestasis [53]. The increased rigidity has not been explained by the significantly changed patterns of fatty acids. Lipid analyses showed only minor changes which could not explain the increased membrane rigidity. Complex GSLs were not analyzed [54, 55, 56].

Histochemical use of CTB-GM1 detection calls our attention to the increased shift of gangliosides from intracellular localization into the sinusoidal membrane, which is dependent on the bile acid concentration in the blood. Considering the well known fact that a higher abundance of GSL increases membrane rigidity, we conclude that the higher amount of GM1 ganglioside localized in lobular zone III, and the shift of GM1 staining from the cytoplasmic into the sinusoidal surface in the liver of EE-treated animals is a response of the hepatocytes to the harmful effects of the increased concentration of bile acids in the sinusoidal blood.

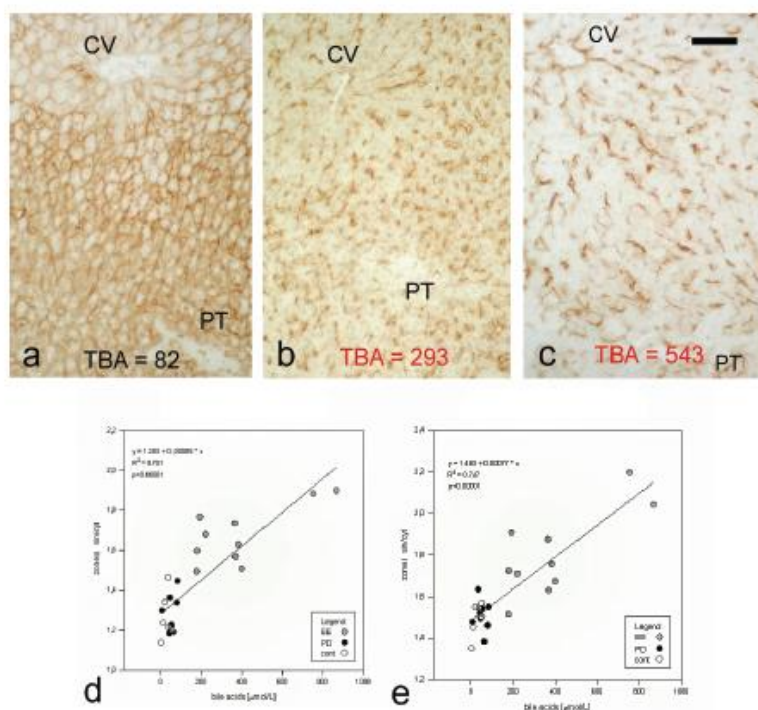


Figure 9. (a-c) GM1 staining in the cytoplasm of PD treated rats (a) decreased rapidly in the cytoplasm of EE treated rats (b and c) with increasing serum TBA (PD= 46; EE=366 and 868  $\mu\text{mol/l}$ ). Bar = 50  $\mu\text{m}$ . Objective magnification in photography 20x (NA=0.5). CV= central vein. PT = portal area. (d) Linear regression analysis between the serum TBA concentration and the difference in GM1 ganglioside content between the sinusoidal membrane and subsinusoidal area of cytoplasm in zone III. (e) Linear regression analysis between the serum TBA concentration and the difference in GM1 ganglioside content between the sinusoidal membrane and subsinusoidal area of cytoplasm in zone I of the hepatic lobules.

## Conclusions

Methods based on the binding of CTB to GM1 are widely used in biochemical, as well as in cytochemical and histochemical analyses. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) makes use of the spontaneous adsorption of amphipathic gangliosides onto plastic surfaces via their ceramide moiety, which leaves the oligosaccharide portion free to react with specific ligands. The ELISA methods are useful for an evaluation of the binding of CTB (or other toxins, in general) to gangliosides, and for the quantification of gangliosides with a constant amount of CTB, as well as for the quantification of lipid rafts.

By use of TLC overlay, CTB can detect GM1 ganglioside directly, or ganglioside after treatment with *Clostridium perfringens* or *Vibrio cholerae* neuraminidase. CTB-GM1 ganglioside binding has a special application in the localization of GM1 as a GSL representative in the plasma membrane rafts.

In histochemistry, one advantage is in the simplicity of this detection, which enables subcellular studies that are impossible to realize by biochemical methods. An example of such an application is the demonstration of the GM1 ganglioside shift into the sinusoidal membrane in EE-induced cholestasis that could be responsible for the protection of hepatocytes against the harmful effects of bile acids, accumulated during cholestasis.

## Acknowledgements

This work was supported by the following grants: SVV-2010-260512, GAUK 251207, and MSM 0021620806.

## Abbreviations Used

bovine serum albumin (BSA), 17 $\beta$ -ethinylestradiol (EE), 1,2-propandiol (PD), glycosphingolipids (GSL), phosphate buffer saline (PBS), total bile acids (TBA).

## References

- [1] Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V. & Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17, 1R-13R.
- [2] Svennerholm, L. (1963). Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem*, 10, 613-623.
- [3] Svennerholm, L. (1994). Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res*, 101, XI-XIV.
- [4] IUPAC-IUB. (1977). Commission on Biological Nomenclature. The nomenclature of lipids. *Recommendations, Lipids*, 12, 455-468.
- [5] Karlsson, K. A. (1989). Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem*, 58, 309-350.
- [6] Todeschini, A. R., Dos Santos, J. N., Handa, K. & Hakomori, S. I. (2008). Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 105, 1925-193.
- [7] Hakomori, S. (2004). Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc*, 76, 553-572.
- [8] Pascher, I. (1976). Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta*, 455, 433-435.

- [9] Harris, P. L. & Thornton, E. R. (1978). Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance of gangliosides. *J Am Chem Soc*, 100, 6738-6745.
- [10] Czarniecki, M. F. & Thornton, E. R. (1977). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spin-lattice relaxation in the N-acetylneuraminic acid. Probes for internal dynamics and conformational analysis. *J Am Chem Soc*, 99, 8273-8278.
- [11] Bertoli, E., Masserini, M., Sonnino, S., Ghidoni, R., Cestaro, B. & Tettamanti, G. (1981). Electron paramagnetic resonance studies on the fluidity and surface dynamics of egg phosphatidylcholine vesicles containing gangliosides. *Biochim Biophys Acta*, 647, 196-202.
- [12] Tettamanti, G., Masserini, M., Giuliani, A. & Pagani, A. (1988). Structure and function of gangliosides. *Ann Ist Super Sanita*, 24, 23-31.
- [13] Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, 378, 281-92.
- [14] Van Heyningen, W. E., Carpenter, C. C., Pierce, N. F. & Greenough, W. B. 3rd. (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *J Infect Dis*, 124, 415-418.
- [15] Holmgren, J., Lönnroth, I. & Svennerholm, L. (1973). Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. *Infect Immun*, 8, 208-214.
- [16] Cuatrecasas, P. (1973). Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry*, 2, 3558-3566.
- [17] King, C. A. & Van Heyningen, W. E. (1973). Deactivation of cholera toxin by a sialidase-resistant monosialosylganglioside. *J Infect Dis*, 127, 639-647.
- [18] Kuziemko, G. M., Stroh, M. & Stevens, R. C. (1996). Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 35, 6375-6384.
- [19] MacKenzie, C. R., Hiram, T., Lee, K. K., Altman, E. & Young, N. M. (1997). Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem*, 272, 5533-5538.
- [20] Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, 109, 129-135.
- [21] Holmgren, J. & Svennerholm, A. M. (1973). Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology. *Infect Immun*, 7, 759-763.
- [22] Holmgren, J., Elwing, H., Fredman, P. & Svennerholm, L. (1980). Polystyrene-adsorbed gangliosides for investigation of the structure of the tetanus-toxin receptor. *Eur J Biochem*, 106, 371-379.
- [23] MacKenzie, C. R. & Hiram, T. (2000). Quantitative analyses of binding affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *Methods Enzymol*, 312, 205-216.
- [24] Lopez, P. H. & Schnaar, R. L. (2006). Determination of glycolipid-protein interaction specificity. *Methods Enzymol*, 417, 205-220.
- [25] Wu, G. S. & Ledeen, R. (1988). Quantification of gangliotetraose gangliosides with cholera toxin. *Anal Biochem*, 173, 368-75.
- [26] Cambron, L. D. & Leskawa, K. C. (1990). A sensitive method to quantitate gangliosides of the gangliotetraose series directly on chromatograms using peroxidase conjugated cholera toxin. *Stain Technol*, 65, 293-297.



- [27] Blackburn, C. C., Swank-Hill, P. & Schnaar, R. L. (1986). Gangliosides support neural retina cell adhesion. *J Biol Chem*, 261, 2873-2881.
- [28] Schauer, R., Veh, R. W., Sander, M., Corfield, A. P. & Wiegandt, H. (1980). "Neuraminidase-resistant" sialic acid residues of gangliosides. *Adv Exp Med Biol*, 125, 283-294.
- [29] Šmíd, F. (unpublished results).
- [30] Holmgren, J. (1994). Receptors for cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin revisited. *Prog Brain Res*, 101, 163-177.
- [31] Fukuta, S., Magnani, J. L., Twiddy, E. M., Holmes, R. K. & Ginsburg, V. (1988). Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxins LT-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun*, 56, 1748-1753.
- [32] Masserini, M., Freire, E., Palestini, P., Calappi, E. & Tettamanti, G. (1992). Fuc-GM1 ganglioside mimics the receptor function of GM1 for cholera toxin. *Biochemistry*, 31, 2422-2426.
- [33] Yanagisawa, M., Ariga, T. & Yu, R. (2006). Cholera toxin B subunit binding does not correlate with GM1 expression: a study using mouse embryonic neural precursor cells. *Glycobiology*, 16, 19G-22G.
- [34] Blank, N., Schiller, M., Krienke, S., Wabnitz, G., Ho, A. D. & Lorenz, H. M. (2007). Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol Cell Biol*, 185, 78-82.
- [35] Parton, R. G. (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem*, 42, 155-166.
- [36] Morales-García, M. G., Fournié J. J., Moreno-Altamirano, M. M., Rodríguez-Luna, G., Flores, R. M. & Sánchez-García, F. J. (2008). A flow-cytometry method for analyzing the composition of membrane rafts. *Cytometry A*, 73, 918-925.
- [37] Thomas, S., Kumar, R. S., Casares, S. & Brumeanu, T. D. (2003). Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane. *J Immunol Methods*, 275, 161-168.
- [38] Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X. Y., Toyo-Oka, K., Tai, X. G., Park, C. S., Hamaoka, T., Abe, R., Myiake, K. & Fujiwara, H. (2000). Non-CD28 Costimulatory Molecules Present in T Cell Rafts Induce T Cell Costimulation by Enhancing the Association of TCR with Rafts. *J Immunol*, 164, 1251-1259.
- [39] Latif, R., Ando, T., Daniel, S. & Davies T. F. (2003). Localisation and Regulation of Thyrotropin Receptors within Lipid Rafts. *Endocrinology*, 144, 4725-4728.
- [40] Samsonov, A. V., Mihalyov, I. & Cohen, F. S. (2001). Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J*, 81, 1486-1500.
- [41] Thompson, T. E., Allietta, M., Brown, R. E., Johnson, M. L. & Tillack, T. W. (1985). Organization of ganglioside GM1 in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 817, 229-237.
- [42] Greaves, M., Capellaro, D., Brown, G., Revesz, T. & Janossy, G. (1976). Analysis of human leukaemic cells using cell surface binding probes and the fluorescence activated cell sorter. *Haematol Bluttransfus*, 19, 243-260.
- [43] Thomas, S., Preda-Pais, A., Casares, S. & Brumeanu, T. D. (2004). Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol*, 41, 399-409.

- [44] Majer, F., Trnka, L., Vitek, L., Jirkovská, M., Mareček, Z. & Šmíd, F. (2007). Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver. *Biomed Chromatogr*, 21, 446-450.
- [45] Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497.
- [46] Suzuki, K. (1965). The pattern of mammalian brain gangliosides. II. Evaluation of the extraction procedures, postmortem changes and the effect of formalin preservation. *J Neurochem*, 12, 629.
- [47] Šmíd, F. & Reinišová, J. (1973). A densitometric method for the determination of gangliosides after their separation by thin-layer chromatography and detection with resorcinol reagent. *J Chromatogr*, 86, 200-204.
- [48] Jirkovská, M., Majer, F., Šmídová, J., Střiteský, J., Dráber, P., Vitek, L., Mareček, Z. & Šmíd, F. (2007). Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. *Glycoconj J*, 24, 231-41.
- [49] Hamilton, P. W. & Allen, D. C. (1995). Morphometry in histopathology. *J Pathol*, 175, 369-379.
- [50] Van Meer, G. & Lisman, Q. (2002). Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem*, 277, 25855-2588.
- [51] Slimane, T. A. & Hoekstra, D. (2003). Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells. Role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell*, 14, 611-624.
- [52] van Ijzendoorn, S. C. D., Zegers, M. M. P., Kok, J. W. & Hoekstra, D. (1997). Segregation of glucosylceramide and sphingomyelin occurs in the apical to basolateral transcytotic route in HepG2 cells. *J Cell Biol*, 137, 347-357.
- [53] Balistreri, W. F., Leslie, M. H. & Cooper, R. A. (1981). Increased cholesterol and decreased fluidity of red cell membranes (spur cell anemia) in progressive intrahepatic cholestasis. *Pediatrics*, 67, 461-466.
- [54] Smith, D. J. & Gordon, E. R. (1988). Role of liver plasma membrane fluidity in the pathogenesis of estrogen-induced cholestasis. *J Lab Clin Med*, 112, 679-685.
- [55] Rosario, J., Sutherland, E., Zaccaro, L. & Simon F. R. (1988). Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition. *Biochemistry*, 27, 3939-3946.
- [56] Vu, D. D., Tuchweber, B., Raymond, P. & Yousef, I. M. (1992). Tight junction permeability and liver plasma membrane fluidity in lithocholate-induced cholestasis. *Exp Mol Pathol*, 57, 47-61.

### 8.3. Příloha 3

Petr T, Šmíd V, Kučerová V, Váňová K, Leníček M, Vítek L, Šmíd F, Muchová L. The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis.

**Physiological Research** 2014; 63(3):359–67.

## The Effect of Heme Oxygenase on Ganglioside Redistribution Within Hepatocytes in Experimental Estrogen-Induced Cholestasis

T. PETR<sup>1</sup>, V. ŠMÍD<sup>1,2</sup>, V. KUČEROVÁ<sup>1</sup>, K. VÁŇOVÁ<sup>1</sup>, M. LENÍČEK<sup>1</sup>, L. VÍTEK<sup>1,2</sup>,  
F. ŠMÍD<sup>1</sup>, L. MUCHOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Fourth Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Received September 23, 2013

Accepted December 13, 2013

On-line February 24, 2014

### Summary

Cholestasis is characterized by the elevation of serum total bile acids (TBA), which leads to the production of both free radicals and oxidative stress. Although they do not share the same mechanisms, membrane glycosphingolipids (GSL) and the antioxidant enzyme heme oxygenase-1 (HMOX1) both act against the pro-oxidative effect of TBA. The aim of the study was to assess the role of HMOX on GSL redistribution and composition within hepatocytes in the rat model of estrogen-induced cholestasis. Compared to the controls, an increase of total gangliosides in the liver homogenates of the cholestatic group ( $P=0.001$ ) was detected; further, it paralleled along with the activation of their biosynthetic b-branch pathway ( $P<0.01$ ). These effects were partially prevented by HMOX activation. Cholestasis was accompanied by a redistribution of GM1 ganglioside from the cytoplasm to the sinusoids; while HMOX activation led to the retention of GM1 in the cytoplasm ( $P=0.014$ ). Our study shows that estrogen-induced cholestasis is followed by changes in the synthesis and/or distribution of GSL. These changes are not only triggered by the detergent power of accumulated TBA, but also by their pro-oxidant action. Increases in the antioxidant defenses might represent an important supportive therapeutic measure for patients with cholestatic liver disease.

### Key words

GM1 ganglioside • Heme oxygenase • Oxidative stress • Intrahepatic cholestasis • 17 $\alpha$ -ethinylestradiol

### Corresponding author

Lucie Muchová, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory

Diagnostics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Bojišti 3, 121 08 Prague 2, Czech Republic. Fax: [+420] 224 964 203. E-mail: lucie.muchova@lf1.cuni.cz

### Introduction

Estrogen-induced cholestasis is a pathological condition characterized by impaired bile flow and the accumulation of bile acids in the plasma of susceptible women, either after estrogen administration or in pregnancy (Vore 1987). Accumulated bile acids in the plasma and the livers of cholestatic individuals can cause liver injury through mechanisms including oxidative stress and structural and/or functional damage of the hepatocyte membrane, due to the detergent properties of bile acids (Kullak-Ublick and Meier 2000, Sokol *et al.* 2001, Roma *et al.* 2008, Fuentes-Broto *et al.* 2009).

Heme oxygenase (HMOX) is a rate-limiting enzyme in heme catabolism, which has antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective properties. The beneficial effects of HMOX are mainly produced through its bioactive products – bilirubin and carbon monoxide (CO) (Vitek and Schwertner 2007, Muchova *et al.* 2011). CO is an important signaling molecule involved in bile secretion, as well as bile canaliculi contractility and liver perfusion; while bilirubin acts as a strong antioxidant, and can protect the liver directly against the oxidative stress triggered by bile acids (Reyes and Simon 1993, Muchova *et al.* 2011).

Gangliosides are glycosphingolipids (GSL), assembled from a lipophilic ceramide portion and



structurally variable hydrophilic oligosaccharide portion containing N-acetylneuraminic acid. Two main biosynthetic pathways of the gangliosides have been described in mammalian cells: 1] a-pathway comprising GM3, GM2, GM1, and GD1a gangliosides; and 2] b-pathway with GD3, GD2, GD1b, and GT1b gangliosides (Kolter *et al.* 2002).

Gangliosides, as well as other GSL, are highly concentrated in the outer layer of the plasmatic membrane. Furthermore, gangliosides, thanks to their unique physical and chemical properties, are considered crucial molecules responsible for the rigidity of cell membranes (Pascher 1976, Harris *et al.* 1978, Pascher *et al.* 1992), as well as contributing to the protection against oxidative stress (Gavella *et al.* 2010).

More than 30 years ago, a decreased fluidity of the liver plasma membrane was observed in cholestasis that had been induced by ethinylestradiol (EE) (Balistreri *et al.* 1981, Smith and Gordon 1988); however, the possible consequences, resulting from the decreased fluidity of the cholestatic membrane, an increase in b-pathway gangliosides, and the redistribution of GM1 ganglioside from the cytoplasm to the sinusoidal membrane of hepatocytes have only recently been described, in 2007 (Jirkovska *et al.* 2007, Majer *et al.* 2007). This supports the hypothesis that not only the increased synthesis of gangliosides, but also their redistribution in a situation of limited biosynthesis, may serve as a protective mechanism against the strong detergent effects of the bile acids accumulated during cholestasis.

The aim of the present study was to assess the potential role of HMOX on GSL redistribution and composition within hepatocytes in the rat model of ethinylestradiol-induced cholestasis.

## Materials and Methods

### Chemicals

Paraformaldehyde, cholera toxin B-subunit biotin-labeled (ChT-B-biotin), streptavidin-peroxidase polymer, albumin, biotin, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, heme, N-acetylneuraminic acid, ammonium acetate, PAP pen for immunostaining, monosialoganglioside GM1 from bovine brain, 1,2-propanediol, diaminobenzidine (DAB)-tetrahydrochloride tablets, and RNAlater were all supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); avidin and N,N-dimethylformamide were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); the DEAE Sephadex was supplied

by GE Healthcare (Little Chalfont, UK). High Performance Silica Plates, resorcinol, and silica gel 60 came from Merck (Darmstadt, Germany); the Faramount Mounting Medium was received from Dako (Glostrup, Denmark); the Total RNA Purification Kit was from Norgen Biotek Corporation (Thorold, Canada); the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and TaqMan Gene Expression Master Mix were from Applied Biosystems (Foster City, USA). All other chemicals were purchased from Penta (Prague, Czech Republic).

### Experimental animals

Female Wistar rats were obtained from Anlab (Prague, Czech Republic), and housed under a controlled temperature and with a natural light-dark cycle. The animals had free access to water and food throughout the experiment. They were forced to fast overnight before the experiment.

Cholestasis was induced by subcutaneous injections of EE (5 mg/kg) diluted in 1,2-propanediol, and applied daily for 18 days (E group). The control groups (C) only received the 1,2-propanediol. Activation of HMOX (aE group) was achieved by intraperitoneal administration of heme (15  $\mu$ mol/kg in 4 doses on days 0, 5, 10, and 15). The heme was dissolved in 0.1 M NaOH, stabilized by albumin solution (1.5 mmol/l heme: 0.15 mmol/l BSA), and then adjusted by 0.1 M HCl to a final pH of 7.4. The minimum number of animals per group was  $n=6$ .

After intramuscular anesthesia with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), the animals were sacrificed, and blood was then obtained from the inferior vena cava for biochemical analyses. Their livers were weighed and then immediately processed for histochemical analysis, isolation of gangliosides and RNA, as well as the determination of HMOX activity.

All aspects of the study met all of the accepted criteria for the experimental use of laboratory animals; all protocols were approved by the Animal Research Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

### Determination of serum markers of liver injury and HMOX activity

The following serum markers of cholestasis and hepatocellular injury were evaluated: total bile acids (TBA), total bilirubin (Bili-T); the activities of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). TBA levels were

determined spectrophotometrically using a Bile Acids kit (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA), all of the other markers were determined on an automatic analyzer (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). HMOX activity was measured by gas chromatography, as previously described (Vreman and Stevenson 1988, 2001), and calculated as pmol CO/h/mg fresh weight.

#### *Peroxy radical scavenging capacity*

The peroxy radical scavenging capacity of the rat serum was detected fluorometrically as the proportion of chain-breaking antioxidant consumption present in the serum, relative to that of Trolox (a reference and calibration antioxidant compound), as previously described (Iuliano *et al.* 2000).

#### *Analysis of liver gangliosides*

The chloroform-methanol extraction of glycolipids from the liver tissue was performed according to Ledeen *et al.* (1973), with minor modifications by Ueno *et al.* (1978). The extract was purified on a silica gel column, again following the method of Ledeen *et al.* (1973). An additional purification of the samples using a Folch partition (Folch *et al.* 1957) was necessary for the removal of heme in the aE samples. This substance has a similar mobility in thin layer chromatography (TLC) as gangliosides, and might interfere with the densitometric measurement. Part of the extract was used for the determination of the total sialic acid (total gangliosides) by the photometric method with resorcinol reagent (Svennerholm 1957, Takki-Luukkainen and Miettinen 1959), the other part was used for TLC quantification of the content of the major gangliosides. GM1 ganglioside, with a known concentration, was applied onto each HPTLC plate in order to correct for any differences caused by the intensity of spraying with the resorcinol HCl reagent. The densitometric measurement was evaluated using CATs3 software (CAMAG, Switzerland).

#### *Determination of glycosyltransferases expression*

Total liver RNA was isolated from samples stored in RNAlater tissue storage reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) using a Total RNA Purification kit (Norgen Biotek Corporation, Canada); and cDNA was generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Real-time PCR was performed with a TaqMan®

Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) for sialyltransferase II (*St8Sial1*, Rn00563093\_m1) and galactosyltransferase II (*B4Galt2*, Rn01417399\_m1). Data were normalized to  $\beta$ -actin (*Actb*, Rn00667869\_m1) and expressed as fold change from the control levels.

#### *Histochemical detection of GM1 ganglioside in rat liver*

Microscopic distribution of GM1 ganglioside (the representative of GSL) was studied in the liver tissue sections by histochemical detections, based on the strong binding of the cholera toxin B-subunit to GM1. Blocks of liver tissue were collected from each animal, frozen, and cryostat sections (6  $\mu$ m thick) were prepared from all blocks. Each animal was represented by six sections.

Before histochemical detection, the slides with sections were fixed with anhydrous acetone and 4 % formaldehyde, as described by Petr *et al.* (2010). GM1 ganglioside was detected by a histochemical reaction with ChT-B-biotin (diluted 1:500 in PBS with 3 % BSA), followed by incubation with streptavidin-peroxidase polymer, diluted 1:400 in PBS. Peroxidase activity was visualized using diaminobenzidine tetrahydrochloride.

#### *Image analysis of the liver sections*

Selected areas from each slide were photographed with an objective magnification of 40X (NA=500). Photographs were taken under constant conditions. The entire area was systematically inspected, and every sixth to seventh screen was photographed using the stratified random sampling method (Hamilton 1995). Lumens of large vessels and artificially damaged areas were excluded from the analysis. The sinusoidal membrane of hepatocytes (sin) and adjacent areas of the cytoplasm (cyt) were traced and subsequently measured. The optical density of the GM1 reaction product was determined using a computer image analysis program ACC 6.0 (SOFO, Czech Republic).

#### *Statistical analysis*

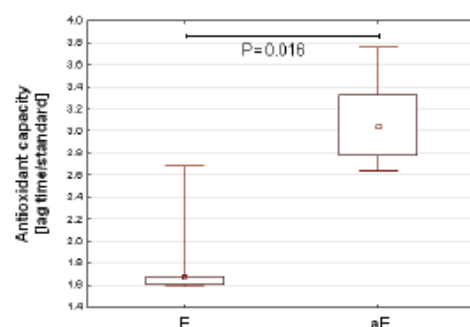
Normally distributed data are presented as the mean  $\pm$  SD, and were analyzed using Student's t-test; skewed data are expressed as the median and 95 % CI, and were analyzed by the Mann-Whitney Rank Sum test. Kruskal Wallis ANOVA with post hoc analysis was used for multiple comparisons. Differences with  $P < 0.05$  were considered statistically significant. The analyses were performed using STATISTICA CZ software, v. 10.

## Results

### *HMOX activation increases serum antioxidant capacity of cholestatic animals*

As expected, EE exposure resulted in significant increases of serum Bili-T ( $1.0 \pm 0.3$  vs.  $3.2 \pm 2.0$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P=0.005$ ), TBA ( $5.5 \pm 5.3$  vs.  $115.2 \pm 71.3$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P=0.005$ ), and ALP ( $1.8 \pm 0.4$  vs.  $3.2 \pm 0.9$   $\mu\text{kat/l}$ ,  $P=0.008$ ), compared to the corresponding controls. Administration of heme, a specific inducer of HMOX1, substantially increased liver HMOX activity in the EE-treated group ( $261.2 \pm 129.1$  vs.  $434.9 \pm 143.7$   $\text{pmol CO/h/mg FW}$ ,  $P=0.031$ ).

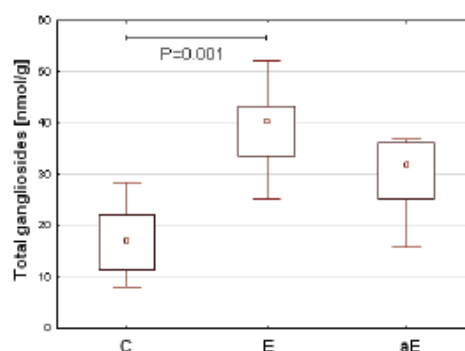
To investigate whether HMOX induction can increase the total antioxidant status of experimental animals, we measured the serum antioxidant capacity of cholestatic rats exposed to heme. Indeed, the heme administration increased the peroxyl radical scavenging capacity of the sera of EE-treated animals by 68 % ( $P=0.016$ , Fig. 1).



**Fig. 1.** The effect of HMOX induction on serum antioxidant capacity of estrogen-exposed animals. Data are expressed as a ratio between the lag time of the serum to that of the standard (Trolox), presented as median, 25-75 % (boxes) and 5-95 % (whiskers). E, estrogen-exposed animals; aE, estrogen-exposed animals treated with heme

### *HMOX activation prevents an increase of total ganglioside content in the cholestatic liver*

Total liver gangliosides (measured as total sialic acid content) were significantly elevated in the cholestatic samples, compared to control group C [ $40.3$  ( $27.4$ - $49.9$ ) vs.  $17.0$  ( $8.9$ - $26.5$ )  $\text{nmol/g}$ ,  $P=0.001$ ]. A much smaller and non-significant increase in the total liver ganglioside content has been observed in the cholestatic samples treated with heme [ $17.0$  ( $8.9$ - $26.5$ ) vs.  $31.9$  ( $16.9$ - $36.8$ )  $\text{nmol/g}$ ,  $P>0.05$ ] (Fig. 2).



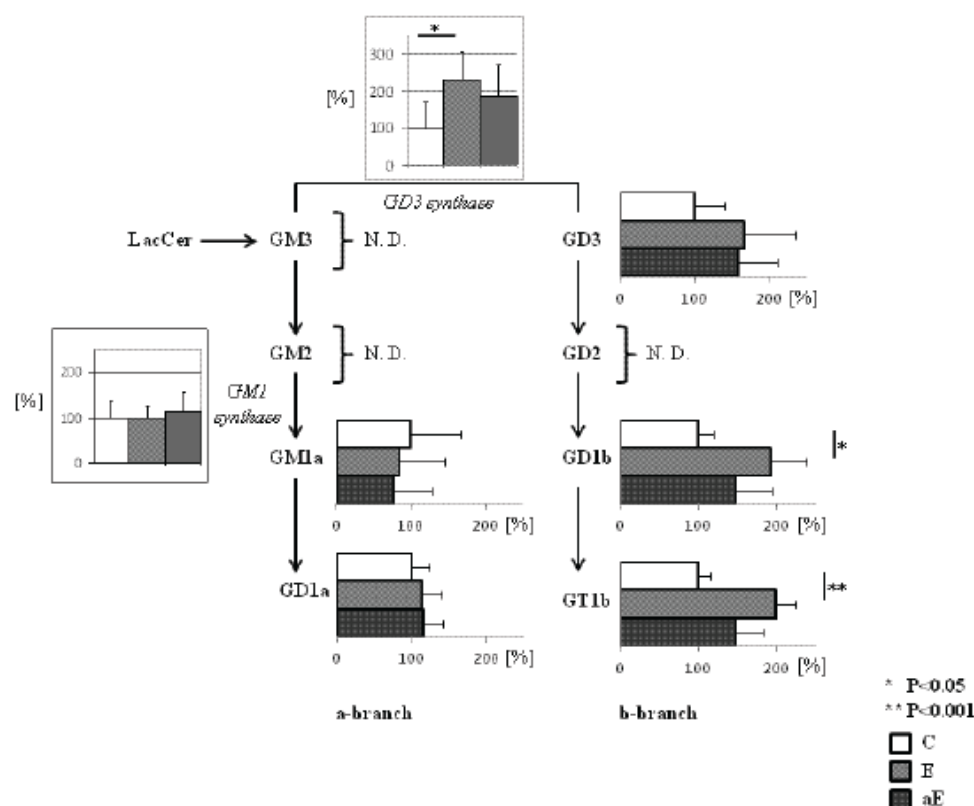
**Fig. 2.** The effect of HMOX induction on total liver gangliosides of cholestatic animals. Liver content of total gangliosides, expressed as median, 25-75 % (boxes) and 5-95 % (whiskers). C, control animals; E, estrogen-exposed animals; aE, estrogen-exposed animals treated with heme

### *Activation of b-terminal branch of ganglioside synthesis in cholestasis is prevented by HMOX*

In this set of experiments, we measured changes in the concentration of individual liver gangliosides after induction of cholestasis and HMOX activation.

No changes in the concentration of gangliosides of the a-biosynthetic pathway (GM1 and GD1a) were observed. However, a significant activation of the terminal part of the b-branch gangliosides (represented by a two-fold increase of GD1b and GT1b,  $P=0.005$  and  $P<0.001$ , respectively) was detected in the cholestatic animals. Interestingly, this activation was partially prevented by HMOX activation, only when mild increases in GD1b and GT1b were observed (Fig. 3).

To determine the rates of activation of the a- and b-branch of ganglioside biosynthetic pathways, we studied the relative expressions of galactosyltransferase II (unspecific GM1-synthase) and sialyltransferase II (specific GD3-synthase) in liver homogenates. Compared to controls, no significant changes were observed in the expression of GM1-synthase in the livers of cholestatic animals ( $98 \pm 27$  % and  $113 \pm 43$  % in E and aE, respectively,  $P>0.05$ ). On the other hand, the expression of GD3-synthase, showing an activation of the b-biosynthetic branch, was markedly increased in the cholestatic samples ( $230 \pm 77$  % of controls,  $P=0.04$ ). This increase was not as pronounced when HMOX had been activated in the cholestatic animals (increased only to  $186 \pm 84$  %,  $P>0.05$ ) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Induction of ganglioside biosynthesis in cholestatic hepatocytes. Relative liver content of individual gangliosides of a- and b-biosynthetic pathways, and relative expressions of key enzymes in ganglioside synthesis. ND, not detected; LacCer, lactosylceramide (precursor of ganglioside synthesis); C, control animals; E, estrogen-exposed animals; aE, estrogen-exposed animals treated with heme

#### HMOX induction affects the GM1 distribution in the cholestatic hepatocytes

To study the changes in the distribution of glycolipids within the liver cell after cholestatic liver injury and HMOX activation, we measured the histochemical localization of GM1 ganglioside (the representative of GSL) in the liver sections.

When compared to the controls, cholestasis was accompanied by a substantial shift of GM1 ganglioside from the cytoplasm to the sinusoidal membrane. Pre-treatment with heme completely abolished this effect; GM1 staining increased in the cytoplasm, but was substantially reduced in membranes (Fig. 4).

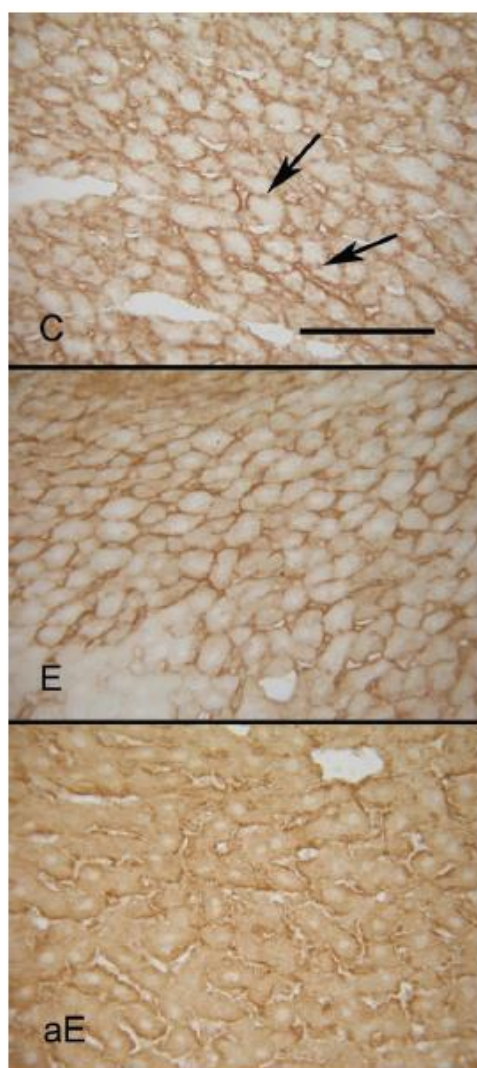
This observation was quantified by the image analysis of GM1 in the subsinusoidal compartment of the cytoplasm (cyt) and the sinusoidal membranes (sin) of hepatocytes. Based on this analysis, the sin/cyt ratio was

calculated, indicating the relative distribution of glycolipids within the liver cell. The results clearly show the shift of GM1 ganglioside from the cytoplasm to membranes in cholestatic samples (sin/cyt ratio  $1.51 \pm 0.19$  vs.  $1.71 \pm 0.10$ ,  $P=0.65$ ); while the shift was reversed by HMOX induction (sin/cyt ratio  $1.71 \pm 0.10$  vs.  $1.31 \pm 0.04$ ,  $P=0.014$ ) (Fig. 5).

#### Discussion

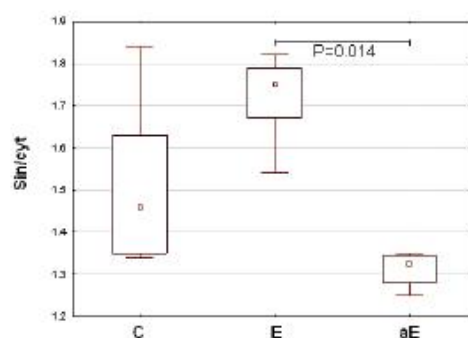
The present study shows that in estrogen-induced cholestasis, it is not only the detergent properties, but also the pro-oxidant properties of the accumulated bile acids that are responsible for increased synthesis and membrane distribution of gangliosides. If the antioxidative response is augmented, the cholestatic pattern of the liver gangliosides is partially reversed.





**Fig. 4.** The effect of HMOX1 induction on GM1 localization in the cholestatic liver. GM1 in the liver sections was detected using ChT-B-biotin with streptavidin-peroxidase polymer, and visualized using diaminobenzidine tetrahydrochloride (brown color). The apparent shift of GM1 positivity from sinusoidal and canalicular membrane (arrowheads) in control group (C) to sinusoidal membrane, only in the cholestatic group (E); or to the cytoplasm in the cholestatic group with activated HMOX1 (aE) can be observed. Bar = 100  $\mu$ m. C, control animals; E, estrogen-exposed animals; aE, estrogen-exposed animals treated with heme

To investigate whether oxidative stress, increased by accumulated bile acids in estrogen-induced cholestasis is responsible for changes in liver ganglioside



**Fig. 5.** The effect of HMOX1 induction on redistribution of GM1 ganglioside within the liver cells. Image analysis of the intensity of GM1 staining in the subsinusoidal compartment of cytoplasm (cyt) and sinusoidal membranes (sin) of hepatocytes, expressed as sin/cyt ratio. C, control animals; E, estrogen-exposed animals; aE, estrogen-exposed animals treated with heme

metabolism, we used an experimental model with activation of the antioxidant enzyme HMOX. We found that administration of the HMOX substrate, heme, to EE-treated animals leads to a significant increase in the serum antioxidant capacity. As we have recently shown (Zelenka *et al.* 2012), activation of HMOX is associated, via formation of its bioactive products, with strong cytoprotective and antioxidant actions, counteracting the pro-oxidative effect of accumulated bile acids in cholestasis (Muchova *et al.* 2011).

In agreement with data published earlier by our group (Majer *et al.* 2007), we observed an increase in ganglioside synthesis (measured as sialic acid content) and the activation of b-branch ganglioside biosynthesis in cholestatic livers. Gangliosides, due to their physical chemical properties, protect cells against harmful extrinsic factors by forming detergent-resistant and rigid domains in the outer leaflet of the plasma membrane (Kanfer and Hakomori 1983, Hakomori 2003). Thus, the increase in total ganglioside content, and particularly the b-series of gangliosides (containing more sialic acid molecules) in cholestatic animals might be a logical response to this insult. Interestingly, antagonizing the pro-oxidative actions of bile acids by HMOX activation in cholestatic animals tended to reverse this increase towards values closer to those of the controls. Considering reports emphasizing the antioxidant properties of gangliosides (Avrova *et al.* 1998, Gavella *et al.* 2007), and the effect of GM1 ganglioside on membrane fluidity in primary rat hepatocytes (Sergeant *et al.* 2005), we speculate that oxidative stress might be an

important factor in regulating ganglioside biosynthesis and membrane stabilization during estrogen-induced cholestasis.

Cholestasis is not only characterized by an increase in ganglioside biosynthesis, but also by their shift from the cytoplasm to the plasma membrane (Jirkovska *et al.* 2007). In accord with this data, we observed the highest membrane GM1 ganglioside content in cholestatic livers. On the other hand, in estrogen-treated animals with HMOX induction, gangliosides did not follow the cholestatic pattern, and a significant drop in membrane ganglioside content was observed.

There are some limitations of our study. First, we can only speculate on the role of GSL redistribution within the membrane of hepatocyte. GSL are part of dynamic membrane rafts having not only protective properties against detergent effects of bile acids but also important signaling functions. This topic needs to be addressed in future studies. Secondly, to clarify the exact role of HMOX on GSL metabolism, further studies with HMOX knock-out animals should be performed.

We conclude that estrogen-induced cholestasis is followed by changes in the synthesis and/or distribution of gangliosides within the hepatocyte. These changes are not only triggered by the detergent properties of highly concentrated bile acids, but also by oxidative stress, and thus might represent a general mechanism of hepatoprotection. Therefore, enhancement of the antioxidative defense mechanisms by HMOX induction

might represent an important supportive therapeutic measure under cholestatic liver conditions.

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### Acknowledgements

We thank Jaroslava Šmídová for preparation of the cryostat sections and help with the immunohistochemical staining; Olga Švejsová and Magdalena Kadlecová for their excellent technical assistance. This research was supported by grants from the Charles University in Prague, Czech Republic, (GAUK 251207; SVV 266516-2013 and PRVOUK-P25/LF1/2); and from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, (IGA MZ NT11327-4/2010).

### Abbreviations

GSL, glycosphingolipids; HMOX, heme oxygenase; GM1,  $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{Cer}$ ; GM2,  $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_3\text{Cer}$ ; GM3,  $\text{II}^3\text{NeuAc-LacCer}$ ; GD1a,  $\text{IV}^3\text{NeuAc,II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{Cer}$ ; GD3,  $\text{II}^3(\text{NeuAc})_2\text{-LacCer}$ ; GD2,  $\text{II}^3(\text{NeuAc})_2\text{-GgOse}_3\text{Cer}$ ; GD1b,  $\text{II}^3(\text{NeuAc})_2\text{-GgOse}_4\text{Cer}$ ; GT1b,  $\text{IV}^3\text{NeuAc,II}^3(\text{NeuAc})_2\text{-GgOse}_4\text{Cer}$ ; LacCer, lactosylceramide; EE, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol; ChT-B-biotin, cholera toxin B-subunit biotin-labeled; TBA, total bile acids; Bili-T, total bilirubin; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase

### References

- AVROVA NF, VICTOROV IV, TYURIN VA, ZAKHAROVA IO, SOKOLOVA TV, ANDREEVA NA, STELMASCHUK EV, TYURINA YY, GONCHAR VS: Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23: 945-952, 1998.
- BALISTRERI WF, LESLIE MH, COOPER RA: Increased cholesterol and decreased fluidity of red cell membranes (spur cell anemia) in progressive intrahepatic cholestasis. *Pediatrics* 67: 461-466, 1981.
- FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957.
- FUENTES-BROTO L, MARTINEZ-BALLARIN E, MIANA-MENA J, BERZOSA C, PIEDRAFITA E, CEBRIAN I, REITER RJ, GARCIA JJ: Lipid and protein oxidation in hepatic homogenates and cell membranes exposed to bile acids. *Free Radic Res* 43: 1080-1089, 2009.
- GAVELLA M, KVEDER M, LIPOVAC V, JURASIN D, FILIPOVI-VINCEKOVIC N: Antioxidant properties of ganglioside micelles. *Free Radic Res* 41: 1143-1150, 2007.
- GAVELLA M, KVEDER M, LIPOVAC V: Modulation of ROS production in human leukocytes by ganglioside micelles. *Braz J Med Biol Res* 43: 942-949, 2010.
- HAKOMORI S: Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol* 10: 16-24, 2003.

- HAMILTON PW: Designing a morphometric study. In: *Quantitative Clinical Pathology*. PW HAMILTON, DC ALLEN (eds), Blackwell Science, Oxford, 1995, pp 311-315.
- HARRIS PL, HARVEY DR, BLISS BP: The importance of plasma lipid, glucose, insulin and fibrinogen in femoropopliteal surgery. *Br J Surg* 65: 197-200, 1978.
- IULIANO L, PICCHERI C, COPPOLA I, PRATICO D, MICHELETTA F, VIOLI F: Fluorescence quenching of dipyrromethane associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. *Biochim Biophys Acta* 1474: 177-182, 2000.
- JIRKOVSKA M, MAJER F, SMIDOVA J, STRITESKY J, SHAIK GM, DRABER P, VITEK L, MARECEK Z, SMID F: Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. *Glycoconj J* 24: 231-241, 2007.
- KANFER JN, HAKOMORI S: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. In: *Sphingolipid Biochemistry*. JN KANFER, S HAKOMORI (eds), Plenum Press, New York, 1983, pp 327-379.
- KOLTER T, PROIA RL, SANDHOFF K: Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* 277: 25859-25862, 2002.
- KULLAK-UBELICK GA, MEIER PJ: Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 4: 357-385, 2000.
- LEDEEN RW, YU RK, ENG LF: Gangliosides of human myelin: sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. *J Neurochem* 21: 829-839, 1973.
- MAJER F, TRNKA L, VITEK L, JIRKOVSKA M, MARECEK Z, SMID F: Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver. *Biomed Chromatogr* 21: 446-450, 2007.
- MUCHOVA L, VANOVA K, ZELENKA J, LENICEK M, PETR T, VEJRAZKA M, STICOVA E, VREMAN HJ, WONG RJ, VITEK L: Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J Cell Mol Med* 15: 1156-1165, 2011.
- PASCHER I: Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta* 455: 433-451, 1976.
- PASCHER I, LUNDMARK M, NYHOLM PG, SUNDELL S: Crystal structures of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1113: 339-373, 1992.
- PETR T, SMID V, SMIDOVA J, HULKOVA H, JIRKOVSKA M, ELLEDER M, MUCHOVA L, VITEK L, SMID F: Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. *Eur J Histochem* 54: 112-117, 2010.
- REYES H, SIMON FR: Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. *Semin Liver Dis* 13: 289-301, 1993.
- ROMA MG, CROCENZI FA, SANCHEZ POZZI EA: Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)* 114: 567-588, 2008.
- SERGEANT O, PEREIRA M, BELHOMME C, CHEVANNE M, HUC L, LAGADIC-GOSSMANN D: Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 104-111, 2005.
- SMITH DJ, GORDON ER: Role of liver plasma membrane fluidity in the pathogenesis of estrogen-induced cholestasis. *J Lab Clin Med* 112: 679-685, 1988.
- SOKOL RJ, STRAKA MS, DAHL R, DEVEREAUX MW, YERUSHALMI B, GUMPRICH E, ELKINS N, EVERSON G: Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res* 49: 519-531, 2001.
- SVENNERHOLM L: Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 24: 604-611, 1957.
- TAKKI-LUUKKAINEN IT, MIETTINEN T: Presence of sialic acid and hexosamine in proteins of the aqueous humour. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 37: 138-142, 1959.
- UENO K, ANDO S, YU RK: Gangliosides of human, cat, and rabbit spinal cords and cord myelin. *J Lipid Res* 19: 863-871, 1978.
- VITEK L, SCHWERTNER HA: The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 43: 1-57, 2007.

- VORE M: Estrogen cholestasis: Membranes, metabolites, or receptors? *Gastroenterology* 93: 643-649, 1987.
- VREMAN HJ, STEVENSON DK: Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. *Anal Biochem* 168: 31-38, 1988.
- VREMAN HJ, STEVENSON DK: Detection of heme oxygenase activity by measurement of CO. *Curr Protoc Toxicol* Chapter 9: Unit 9.2, 2001.
- ZELENKA J, MUCHOVA L, ZELENKOVA M, VANOVA K, VREMAN HJ, WONG RJ, VITEK L: Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. *Biochimie* 94: 1821-1827, 2012.
-



#### **8.4. Příloha 4**

Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, Sticova E, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress.

**Journal of Cellular and Molecular Medicine** 2011; 15(5):1156-65.doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01098.x.

## Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress

Lucie Muchova<sup>a, \*</sup>, Katerina Vanova<sup>a</sup>, Jaroslav Zelenka<sup>a</sup>, Martin Lenicek<sup>a</sup>, Tomas Petr<sup>a</sup>, Martin Vejrazka<sup>b</sup>, Eva Sticova<sup>c</sup>, Hendrik Jan Vreman<sup>d</sup>, Ronald James Wong<sup>d</sup>, Libor Vittek<sup>a, e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Medical Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

<sup>e</sup> 4th Department of Internal Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received: December 11, 2009; Accepted: April 8, 2010

### Abstract

High plasma concentrations of bile acids (BA) and bilirubin are hallmarks of cholestasis. BA are implicated in the pathogenesis of cholestatic liver damage through mechanisms involving oxidative stress, whereas bilirubin is a strong antioxidant. We evaluated the roles of bilirubin and BA on mediating oxidative stress in rats following bile duct ligation (BDL). Adult female Wistar and Gunn rats intraperitoneally anaesthetized with ketamine and xylazine underwent BDL or sham operation. Cholestatic markers, antioxidant capacity, lipid peroxidation and heme oxygenase (HO) activity were determined in plasma and/or liver tissue 5 days after surgery. HepG2-rNtcp cells were used for *in vitro* experiments. Plasma bilirubin levels in control and BDL animals positively correlated with plasma antioxidant capacity. Peroxyl radical scavenging capacity was significantly higher in the plasma of BDL Wistar rats ( $210 \pm 12\%$ ,  $P < 0.0001$ ) compared to controls, but not in the liver tissues. Furthermore after BDL, lipid peroxidation in the livers increased ( $179 \pm 37\%$ ,  $P < 0.01$ ), whereas liver HO activity significantly decreased to 61% of control levels ( $P < 0.001$ ). Addition of taurocholic acid (TCA,  $\geq 50 \mu\text{M}$ ) to liver homogenates increased lipid peroxidation ( $P < 0.01$ ) in Wistar, but not in Gunn rats or after the addition of bilirubin. In HepG2-rNtcp cells, TCA decreased both HO activity and intracellular bilirubin levels. We conclude that even though plasma bilirubin is a marker of cholestasis and hepatocyte dysfunction, it is also an endogenous antioxidant, which may counteract the pro-oxidative effects of BA in circulation. However, in an animal model of obstructive cholestasis, we found that BA compromise intracellular bilirubin levels making hepatocytes more susceptible to oxidative damage.

**Keywords:** taurocholic acid • heme oxygenase • carbon monoxide • lipid peroxidation

### Introduction

Obstructive cholestasis, characterized by a failure to secrete bile into the bile duct and intestine, results in the accumulation of bile acids (BA) and bilirubin in circulation. Elevated activities of cholestatic enzymes and plasma levels of bilirubin and BA are used as laboratory markers of cholestasis.

The accumulation of BA inside hepatocytes is the major cause of cholestatic liver damage [1], including structural and functional injuries of hepatocyte membranes [2], cell death [3] and activation of inflammatory and fibrogenic signalling pathways [4]. Several studies have suggested an important role of increased oxidative stress in the pathogenesis of cholestatic injury [5, 6]. Accumulated BA within hepatocytes impair mitochondrial respiration and electron transport and stimulate the generation of reactive oxygen species (ROS) in hepatic mitochondria [7]. Accordingly, mitochondrial free radicals may then modify nucleic acids, proteins and lipids. In fact, an increase in lipid peroxidative products has been observed in cholestatic livers [8].

\*Correspondence to: Lucie MUCHOVA, M.D., Ph.D.,  
Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,  
1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague,  
Na Bojišti 3, Praha 2, 121 08, Czech Republic.  
Tel: 00420 224 964 199  
Fax: 00420 224 962 532  
E-mail: lucie.muchova@lf1.cuni.cz

The liver possesses a complex defence system including antioxidant enzymes and substrates to control the formation of ROS and repair oxidative damage [9]. Bilirubin, a product of heme catabolism, is a potent antioxidant substance both *in vitro* [10] and *in vivo* [11]. *In vitro* studies with liposomes have shown that both unconjugated (UCB) and conjugated bilirubin (CB) are protective against lipid peroxidation, surpassing that of  $\alpha$ -tocopherol, an important lipid-soluble antioxidant [10]. Antioxidant properties of bilirubin were further confirmed by a number of animal and clinical studies demonstrating the protective effects of bilirubin on the development of atherosclerosis [12–14], cancer [15, 16] and other oxidative stress-mediated diseases [17].

The objective of this study was to address the seemingly dichotomous effects of high levels of the antioxidant bilirubin and the pro-oxidant BA in obstructive cholestasis using an animal model.

## Materials and methods

### Animals

Female Wistar rats obtained from Anlab (Prague, Czech Republic) and hyperbilirubinemic Gunn rats (RHA/j), in-house colony from 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague) with a congenital deficiency of bilirubin uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferase, both weighing from 200 to 280 g, were provided water and food *ad libitum*. All aspects of the animal studies met the accepted criteria for the care and experimental use of laboratory animals, and all protocols were approved by the Animal Research Committee of the 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

### Reagents

L-Ascorbic acid, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), bovine serum albumin (BSA) 98%, UCB, chloroform (high-performance liquid chromatography [HPLC] grade), hemin, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), sulfosalicylic acid, taurocholic acid (TCA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade purchased from Penta (Prague, Czech Republic). UCB was purified and recrystallized according to McDonagh and Alesi [18]. Purified UCB was dissolved in 0.1 M NaOH and immediately neutralized with phosphoric acid. The mixture was subsequently diluted with BSA solution to reach a final concentration of 480  $\mu$ M UCB and 500  $\mu$ M BSA in phosphate buffer (25 mM, pH 7.0).

### Bile duct ligation (BDL)

Rats were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally, and biliary trees were exposed through midline abdominal incisions. Microsurgical ligation of bile ducts and resections of extrahepatic biliary tracts were performed as previously described ( $n = 7$  in each group) [19]. Sham-operated (SH) rats underwent the same procedure without bile duct resection and ligation ( $n = 6$  in each group).

### Tissue preparation

After 5 days, all animals were killed and blood (5 ml) was collected from superior vena cava, transferred to tubes containing EDTA, mixed, and placed on ice. An aliquot was centrifuged to separate plasma. Livers were then harvested, thoroughly washed with 10 ml heparinized saline, and rinsed in ice-cold reaction buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). For RNA analysis, 100 mg of tissue was immediately placed in 1.5 ml microfuge tubes containing RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tubes were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until total RNA isolation.

For HO activity, HO-1 protein, and lipid peroxidation measurements, 100–150 mg tissue was diluted 1:9 (by weight) in reaction buffer, diced, and sonicated with an ultrasonic cell disruptor (Model XL2000, Misonix, Farmingdale, NY, USA). Sonicates were kept on ice and assayed for HO activity or lipid peroxidation within 1 hr or frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of HO-1 protein.

For liver carbon monoxide (CO) measurements, 150–200 mg tissue was diluted 1:4 in reaction buffer and then sonicated as described above.

For malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenal analysis, 200 mg of tissue was placed in the Eppendorf tube containing 0.1 M PBS, pH 7.4 with 1% BHT, diced and sonicated. Sonicates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Markers of cholestasis

Plasma biochemical markers (alkaline phosphatase [ALP], albumin) were determined in an automatic analyser (Hitachi, Model 717, Tokyo, Japan), using standard assays. Total plasma BA levels were determined spectrophotometrically using a Bile Acids kit (Trinity Biotech, Jamestown, NY, USA).

### Liver histology

For histological examination, left lateral lobes of livers were fixed overnight in 10% buffered formalin (pH 7.4) at  $4^{\circ}\text{C}$  followed by a standard procedure for paraffin embedding. Serial sections (6  $\mu$ m thick) were cut and stained with haematoxylin and eosin, Shikata's orcein method, or elastic-van Gieson stain. Each slide was viewed using standard light microscopy.

### Peroxy radical scavenging capacity

Peroxy radical scavenging capacity was measured fluorometrically as a proportion of chain-breaking antioxidant consumption present in a biologic sample (plasma, liver homogenate) relative to that of Trolox (a reference and calibration antioxidant compound) as previously described [20].

### Bilirubin determination

Plasma and liver CB and UCB levels were determined using an HPLC method as previously described [21]. Briefly, pigments were extracted into chloroform-hexane and subsequently delipidated by second extraction into a minute volume of alkaline aqueous solution. The resulting droplet was separated on HPLC.

## Heme oxygenase (HO) activity

Twenty microlitres of 10% liver sonicate (2 mg fresh weight [FW]) was incubated for 15 min. at 37°C in CO-free septum-sealed vials containing 20 µl of 150 µM methemalbumin and 20 µl of 4.5 mM NADPH as previously described [22]. Blank reaction vials contained 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, in place of NADPH. Reactions were terminated by adding 5 µl of 30% (w/v) sulfosalicylic acid. The amount of CO generated by the reaction and released into the vial headspace was quantitated by gas chromatography (GC) with a reduction gas analyser (Trace Analytical, Menlo Park, CA, USA). HO activity was calculated as pmol CO/hr/mg FW.

## Real-time RT-PCR

Total liver RNA was isolated using phenol : chloroform extraction and cDNA was generated using random hexamer primers and Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Real-time PCR was performed with TaqMan® Gene Expression Assay Kit for HO-1 (Applied Biosystems, Alameda, CA, USA). Data were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and hypoxanthine phosphoribosyl transferase levels, and then expressed as fold change from control.

## Western blots

One hundred micrograms of liver sonicates were mixed with equal volume of loading buffer. Samples were separated on 12% polyacrylamide gel and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). After blocking in Tween-PBS with 5% milk for at least 1 hr, membranes were incubated with HO-1 antibody (1:666; Streegen, Victoria, BC, USA), or  $\beta$ -actin (1:8000; Sigma-Aldrich) for 1 hr. After washing, membranes were incubated with anti-mouse IgG-HRP (1:2000; Sigma-Aldrich) for 30 min. After washing, immunocomplexes on the membranes were visualized with ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). HO-1 protein bands were quantified by densitometry, normalized to  $\beta$ -actin, and then expressed as fold change from control.

## Liver tissue CO

Forty microlitres of liver sonicate was added to CO-free, septum-sealed vials containing 5 µl of 60% (w/v) sulfosalicylic acid. After 30 min. incubation on ice, CO released into the vial headspace was quantitated by GC as previously described [23].

## Carbonylhaemoglobin (COHb) determination

Total haemoglobin was estimated to be 15 g/dl for all the animals. COHb was measured by GC as previously described [24] and expressed as percentage of total haemoglobin.

## Lipid peroxidation

Twenty microlitres of liver sonicate was incubated for 30 min. at 37°C with 100 µM ascorbate (80 µl) and 6 µM Fe<sup>2+</sup> (0.5 µl). BHT (100 µM) was

added for the blank reaction. CO produced into vial was quantitated by GC as previously described [25]. The amount of CO produced serves as an index of lipid peroxidation and was expressed as pmol CO/hr/mg FW. Total amounts of lipid peroxidation end-products, MDA and 4-hydroxyalkenals were determined using Biotek<sup>®</sup> LPO-586 Assay (Oxis International, Beverly Hills, CA, USA).

## Cell culture

The human hepatoblastoma cell line (HepG2) (purchased from American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and HepG2 cell line stably transfected with Ntcp transporter (HepG2-rNtcp), kindly provided by Professor Ulrich Beuers (University of Munich, Germany; currently University of Amsterdam, Netherlands), were cultured as described previously [26]. Cells were grown on 10 cm Petri dishes (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium), incubated with TCA for 24 hrs for HO activity and intracellular bilirubin or 4 hrs for mRNA determination. After incubation, cells were quickly washed three times with 10 ml PBS, harvested, centrifuged and pellet was dispersed in 300 µl of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. For mRNA determination, cell pellets were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. An aliquot of the cell sonicates was used for protein determination (Bio-Rad DC protein assay, Hercules, CA, USA).

## Statistical analyses

Normally distributed data are presented as means  $\pm$  S.D. and analysed by Student t-test. Non-normally distributed datasets are expressed as medians (25%–75%) and analysed by Mann-Whitney rank sum test. The association between plasma bilirubin levels and antioxidant capacity was tested using Spearman rank-order correlation analysis. Differences were deemed statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### Markers of cholestasis and liver histology

Significant increases in total BA and ALP were observed in all BDL rats (Table 1). As expected, plasma bilirubin levels were significantly elevated in Wistar rats after BDL. In Gunn rats, which are deficient in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase, plasma UCB levels remained unchanged after BDL (Table 2), as expected because most of the bilirubin does not enter the intestinal lumen via biliary excretion, but rather via direct diffusion across the intestinal mucosa [27].

Histological analysis of liver specimens from BDL rats revealed signs of impaired bile flow, such as large bile duct obstruction with intralobular bilirubinostasis (predominantly in perivenular localisation) and biliary interface activity with portal tract oedema, swelling of periportal hepatocytes and marked ductular proliferation with a disruption of the parenchymal limiting plates, accompanied by polymorphonuclear infiltration. Bile plugs

**Table 1** Cholestatic markers and liver and body weights

	Wistar (SH) (n = 6)	Wistar (BDL) (n = 7)	Gunn (SH) (n = 6)	Gunn (BDL) (n = 7)
Body weight (g)	235 (233–237)	218 (212–240)	253 (206–280)	220 (200–264)
Liver weight (g)	10.4 (9.8–11.0)	14.0 (13.6–14.6)**	11.0 (10.5–11.5)	12.9 (11.5–13.6)*
TBA (μmol/l)	14.5 (10.3–23.3)	326 (290–404)**	8.5 (8.0–12.8)	288 (248–416)**
ALP (μkat/l)	2.1 (1.9–2.2)	4.4 (4.2–4.6)**	0.9 (0.8–1.0)	5.1 (3.9–5.6)**

Cholestatic markers and liver and body weights in SH and BDL Wistar and Gunn rats 5 days after surgery. Data are presented as median (25–75%).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  compared to corresponding SH group.

TBA: total plasma bile acids, ALP: alkaline phosphatase.

**Table 2** Plasma and liver bilirubin

	SH-plasma (μmol/l) (n = 6)	BDL-plasma (μmol/l) (n = 7)	SH-liver (nmol/g) (n = 6)	BDL-liver (nmol/g) (n = 7)
<b>Wistar</b>				
TB	0.32 (0.16–0.37)	193.8 (176.4–195.5)**	2.65 (2.33–3.50)	40.7 (31.5–57.1)**
CB	0	181.4 (164.8–190.2)**	1.73 (1.18–2.39)	39.2 (30.1–54.8)**
UCB	0.32 (0.16–0.37)	8.67 (3.75–13.03)**	1.07 (0.88–1.28)	2.03 (1.75–2.37)*
<b>Gunn</b>				
UCB	137.8 (130.0–145.4)	149.1 (135.4–212.6)	45.2 (40.7–46.1)	24.6 (19.6–28.5)*

Plasma and liver bilirubin in SH and BDL Wistar and Gunn rats 5 days after surgery. Data are presented as medians (25–75%).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , compared to corresponding SH group.

TB: total bilirubin, UCB: unconjugated bilirubin, CB: conjugated bilirubin.

were present in a few cholangioles and bile infarcts were found in periportal zones.

### Bilirubin increases antioxidant capacity in plasma, but not in liver homogenates of BDL rats

Peroxyl radical scavenging capacity was significantly higher in BDL compared to SH Wistar rats ( $210 \pm 13$  and  $100 \pm 30\%$ , respectively  $P < 0.001$ ) (Fig. 1A). We suggest that this increase could be attributed to elevated plasma bilirubin levels. In fact, plasma antioxidant capacity correlated positively with plasma total bilirubin levels (Spearman correlation coefficient = 0.45,  $P = 0.027$ ). Unlike in plasma, we did not find any differences in peroxyl radical scavenging capacity in liver homogenates of BDL and SH Wistar rats ( $113 \pm 17$  and  $100 \pm 17\%$ , respectively,  $P = 0.21$ ) (Fig. 1A).

To further confirm our hypothesis, we investigated the effect of bilirubin and that of TCA on peroxyl radical scavenging capacity in normal rat plasma. Addition of bilirubin resulted in a dose-dependent increase in peroxyl radical scavenging capacity, whereas no effect was observed with TCA (Fig. 1B).

### Liver bilirubin levels are relatively decreased compared to plasma in BDL animals

Markedly different antioxidant capacities of plasma and liver homogenates of BDL Wistar rats prompted us to measure bilirubin concentrations in those two compartments. Compared to SH rats, plasma bilirubin levels were 606 times higher in BDL Wistar rats. Surprisingly, in liver sonicates, only a 15-fold increase of bilirubin was observed in BDL rats. In Gunn rat livers, we found a significant decrease of 46% in the liver bilirubin levels in BDL rats compared to SH rats, whereas no significant differences were found in plasma (Table 2).

### Bilirubin production is decreased and lipid peroxidation is increased following BDL

To identify the possible underlying mechanism for the relative lack of bilirubin in cholestatic hepatocytes, we investigated the rate of bilirubin production in the liver of Wistar rats. Activity of HO, the rate-limiting enzyme of bilirubin synthetic pathway, was



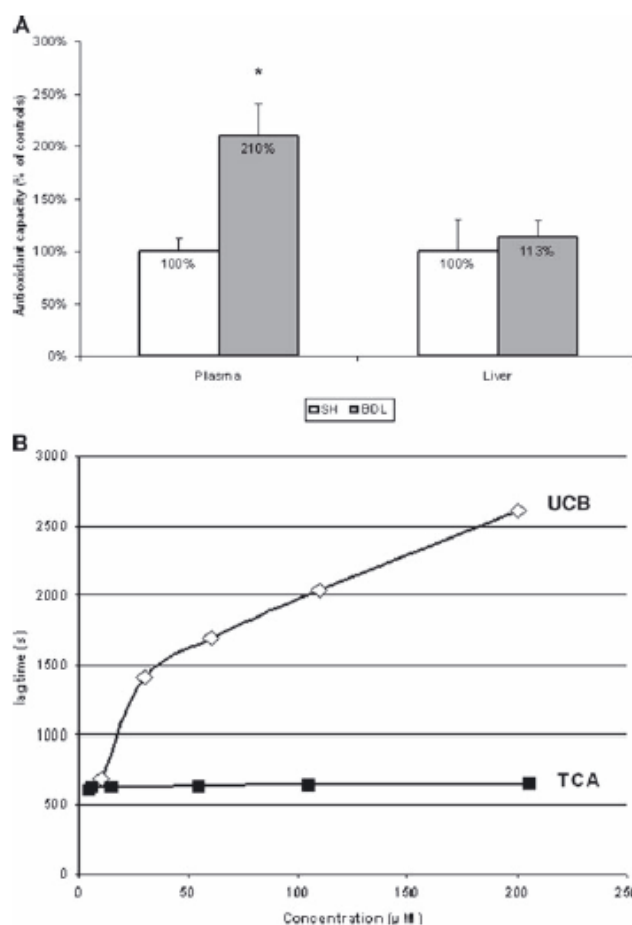


Fig. 1 Antioxidant capacity in plasma and liver homogenates of control (SH) and BDL rats. Effect of bilirubin and TCA. (A) Peroxyl radical scavenging capacity of plasma and liver homogenates from SH ( $n = 6$ ) and BDL Wistar rats ( $n = 7$ ). (B) Effect of UCB and TCA on peroxyl radical scavenging capacity (lag time) of normal rat plasma.

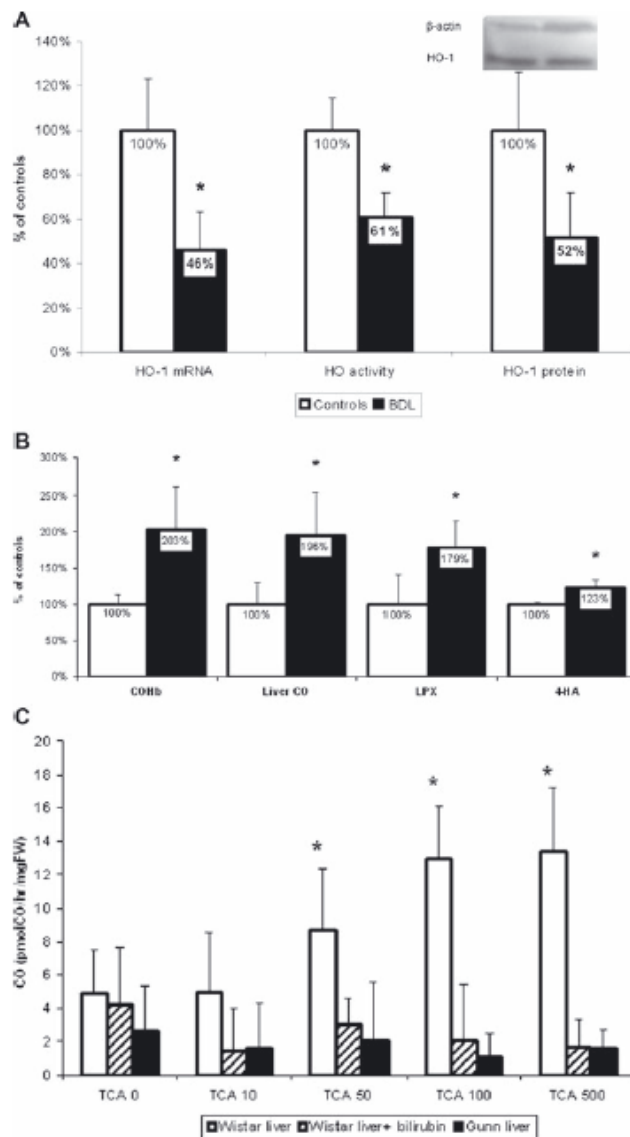
significantly decreased (54%) in the livers of BDL rats compared to controls ( $199 \pm 36$  versus  $327 \pm 48$  pmol CO/hr/mg FW,  $P = 0.003$ ). Similarly, HO-1 mRNA expression and HO-1 protein were also significantly down-regulated in BDL livers (Fig. 2A).

Surprisingly, we found significant increases in liver tissue CO and blood COHb levels of cholestatic rats compared to those of controls ( $7.9 \pm 2.4$  versus  $4.0 \pm 1.1$  pmol CO/mg FW and  $0.36 \pm 0.04$  versus  $0.18 \pm 0.02\%$  total haemoglobin, respectively,  $P < 0.05$ , Fig. 2B). Because lipid peroxidation represents another source of CO *in vivo* [28], besides HO activity, we analysed the potential for lipid peroxidation. Livers of BDL animals were more susceptible to lipid peroxidation than control livers ( $85 \pm 18$

versus  $47 \pm 17$  pmol CO/mg FW, respectively,  $P = 0.005$ ). These results were confirmed by direct measurements of liver MDA and 4-hydroxyalkenals, which were significantly higher in BDL compared to SH rats ( $122 \pm 15$  and  $99 \pm 3$  μmol/g, respectively,  $P = 0.004$ ).

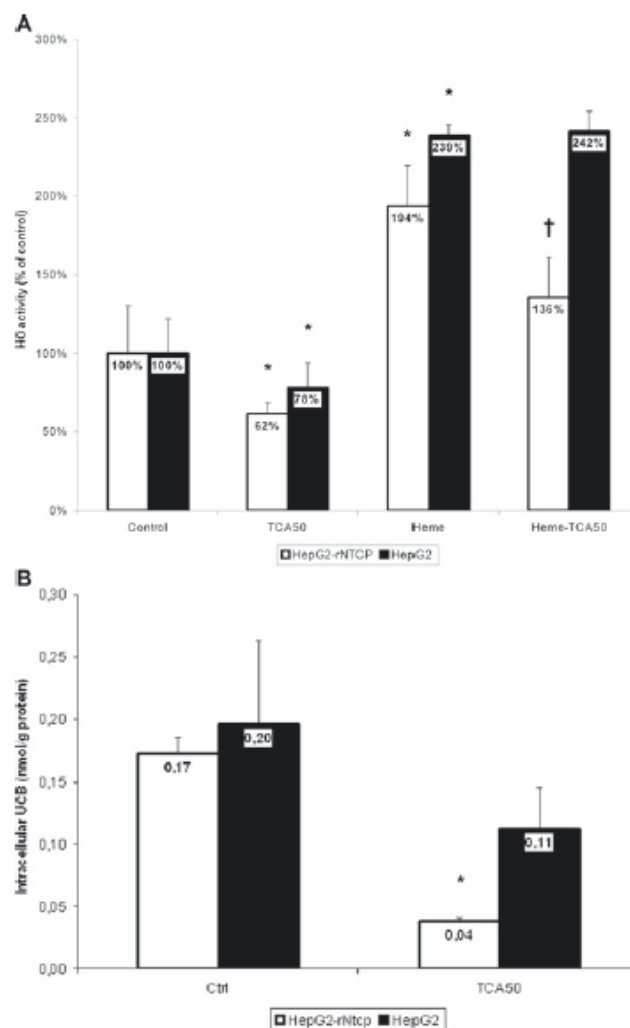
#### TCA increases lipid peroxidation in the liver homogenates

To investigate the role of BA in lipid peroxidation, we analysed the effect of increasing concentrations of TCA in normal Wistar



**Fig. 2** Bilirubin production and lipid peroxidation following BDL in Wistar rats. Effect of TCA and bilirubin on lipid peroxidation in Wistar and Gunn rat liver homogenates. (A) Activity and expression of HO in liver tissue of sham-operated and BDL Wistar rats. Densitometric values of HO-1 protein were normalized to  $\beta$ -actin and all data are expressed as percentage of controls.  $*P < 0.05$ . (B) CO in liver tissue and in the blood (COHb), lipid peroxidation and 4-hydroxyalkenals of cholestatic Wistar rats compared to control animals. Data are expressed as percentage of controls.  $*P < 0.05$ . (C) TCA was added to normal liver homogenates of Wistar and Gunn rats or Wistar rat liver homogenates with 40  $\mu$ M bilirubin in concentrations of 0, 10, 50, 100 and 500  $\mu$ M and lipid peroxidation was measured.  $*P < 0.05$ .

Fig. 3 Effect of TCA on HO activity and intracellular bilirubin *in vitro*. (A) HepG2 and HepG2-rNtcp cells (stably transfected with Ntcp transporter) were incubated for 24 hrs with 50  $\mu$ M TCA, 30  $\mu$ M heme (HO-1 inducer) or co-incubated with 50  $\mu$ M TCA and 30  $\mu$ M heme and HO activity was determined. \* $P$  < 0.05 compared to controls, † $P$  < 0.05 compared to heme-treated cells. (B) Intracellular bilirubin levels were measured in HepG2 and HepG2-rNtcp cells 24 hrs after incubation with 50  $\mu$ M TCA. \* $P$  < 0.05.



rat and Gunn rat liver homogenates. TCA at concentrations of 50, 100 and 500  $\mu$ M significantly increased lipid peroxidation in Wistar rat liver homogenates. This effect was completely abolished by addition of 40  $\mu$ M UCB. In Gunn rats, TCA had no effect on lipid peroxidation within mentioned concentration range (Fig. 2C).

#### TCA decreases intracellular bilirubin in HepG2-rNtcp cells

Treatment of HepG2 cells stably transfected with the Ntcp transporter with 50  $\mu$ M TCA resulted in a significant decrease in HO activity ( $2.43 \pm 0.73$  nmol CO/hr/mg protein in controls



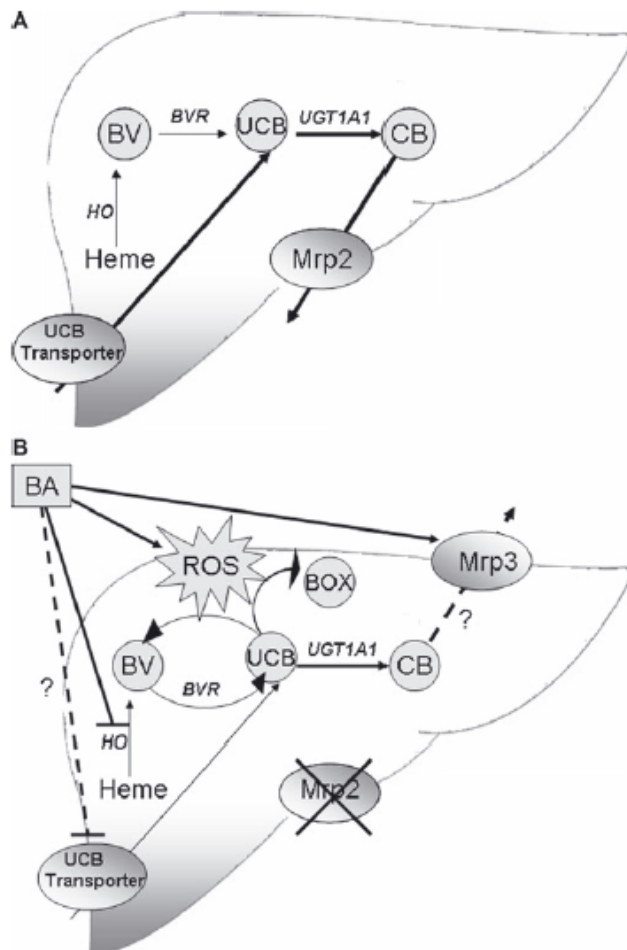


Fig. 4 Proposed bilirubin metabolism in normal (A) and cholestatic (B) rat liver. (A) Under normal conditions, UCB enters hepatocytes via carrier mediated mechanism (though the transporter involved still remains to be identified) [36, 37] or is produced intracellularly by oxidative degradation of heme. Intracellular UCB undergoes conjugation catalyzed by bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) and CB is eliminated into bile via Mrp2 transporter. (B) High concentrations of bile acids in cholestatic liver lower bilirubin concentration by (1) triggering oxidative stress which leads to bilirubin consumption through biliverdin reductase (BVR) catalytic cycle [38] and via bilirubin oxidation products (BOX) formation (reviewed in [39]), (2) down-regulation of HO resulting in lower bilirubin production and (3) possibly by altering the expression of the basolateral transporters [31]. CB enters systemic circulation across the sinusoidal membrane possibly via up-regulated sinusoidal Mrp3 transporter.

versus  $1.50 \pm 0.11$  nmol CO/hr/mg protein in TCA-treated cells,  $P = 0.01$ , Fig. 3A) and HO-1 mRNA ( $100\% \pm 15\%$  versus  $57\% \pm 23\%$ ,  $P = 0.03$ ). As expected, treatment with  $30 \mu\text{M}$  heme resulted in increase in HO activity though this effect was significantly reduced by co-treatment with TCA. Treatment of HepG2 cells (lacking Ntcp transporter for conjugated BA) with  $50 \mu\text{M}$  TCA resulted in milder decrease in HO activity compared to HepG2-rNtcp cells ( $1.56 \pm 0.34$  nmol CO/hr/mg protein in controls versus  $1.22 \pm 0.19$  nmol CO/hr/mg protein in TCA-treated cells,  $P = 0.03$ ) and no decrease in HO-1 mRNA ( $100\% \pm 10\%$

versus  $89\% \pm 13\%$ ,  $P = 1$ ). Interestingly, no decrease in HO activity has been observed upon co-treatment with heme plus TCA compared to heme-treated HepG2 cells.

Following treatment with  $50 \mu\text{M}$  TCA, intracellular bilirubin decreased 78% in HepG2-rNtcp cells and only 43% decrease in HepG2 cells compared to control (untreated) cells (Fig. 3B). The decrease of intracellular bilirubin by 78% corresponded to a 31% decrease in HO activity in HepG2-rNtcp cells, suggesting that intracellular bilirubin might be also influenced by other mechanisms (Fig. 4).

## Discussion

In this study, we demonstrated that bilirubin is not only a marker of cholestasis and hepatocyte dysfunction; but also, it is an endogenous antioxidant, counteracting the pro-oxidative effects of BA. In addition, we showed that BA lower intrahepatic bilirubin levels and bilirubin production presumably through an interaction between BA and bilirubin.

We found that BDL significantly increases the antioxidative capacity of plasma. Because of the significant positive correlation of plasma antioxidant capacity with bilirubin levels, it appears that bilirubin is the major antioxidant factor. This is supported by the finding that additions of UCB to normal rat plasma increased its antioxidative properties in dose-dependent fashion. These results agree with the data of Granato *et al.* [29] who demonstrated that bilirubin effectively suppresses ROS generation in freshly isolated hepatocytes.

However, a completely different circumstance may exist within liver tissue. BDL did not increase the antioxidant capacity in liver homogenates. We propose that this finding could, at least in part, be explained by the markedly different increases of bilirubin levels in plasma and liver compartments. After BDL, plasma levels of bilirubin increased more than 600-fold; whereas, in the liver only a 15-fold increase was observed. Furthermore, considering the high plasma bilirubin levels, the contamination of the liver with trace amounts of blood could artifactually actually increase liver bilirubin levels. Therefore, liver tissue bilirubin might be even lower in BDL animals compared to controls. Importantly, in Gunn rats, where BDL does not significantly affect plasma bilirubin levels (due to bilirubin elimination across the intestinal mucosa rather than the biliary tract), we observed a marked drop (54%) of liver bilirubin in BDL animals. These findings are of particular importance showing, for the first time, that intracellular bilirubin is actually consumed during cholestasis and that plasma bilirubin concentrations do not necessarily reflect tissue bilirubin metabolism.

To identify possible mechanisms responsible for this lowering of liver bilirubin levels following BDL, we treated HepG2 and HepG2-rNtcp cells with TCA. We found, that TCA down-regulates both the expression and activity of HO (the key enzyme in bilirubin production) and this down-regulation is more pronounced in cells expressing the Ntcp transporter. Accordingly, TCA lowered intracellular bilirubin levels. The markedly higher decrease in intracellular bilirubin compared to that of HO activity suggests that other mechanisms might also be involved. We have previously demonstrated an increased consumption of intracellular bilirubin during oxidative stress [30]. These effects could, together with BA-mediated alteration of bilirubin transport mechanisms [31], account for the relatively low hepatocyte bilirubin levels (Fig. 4).

The present study shows that in obstructive cholestasis, high concentrations of BA are responsible for increased lipid peroxidation in the liver as measured by the accumulation of MDA and

4-hydroxyalkenals, the products of lipid peroxidation. These findings agree with published data showing that MDA levels are increased in the livers of BDL rats [32, 33]. We have also observed increases in liver tissue CO and blood COHb in cholestatic animals. Because HO activity and expression (the main source of CO) are decreased in the livers of BDL animals, our observed elevations of CO concentration could be due to lipid peroxidation [25]. This is supported by our experiments where the addition of TCA to normal liver homogenates increased lipid peroxidation in a dose-dependent manner. However, addition of 40  $\mu$ M bilirubin to liver homogenate completely abolished this effect. Additionally, no increase in lipid peroxidation was observed following the addition of TCA to liver homogenates from hyperbilirubinemic Gunn rats. All these data further confirm the opposing roles of BA and bilirubin in the development of oxidative stress and support the hypothesis that the higher BA/bilirubin ratio in cholestatic livers could lead to an increased susceptibility of the BDL livers to lipid peroxidation. These observations support also our previous data, showing that treatment of mice with HO inducer, rosvastatin, led to simultaneous increase in heart HO activity and bilirubin content, but decrease in lipid peroxidation. Pre-treatment with a potent HO inhibitor, tin mesoporphyrin, completely abolished this effect [34].

There are several limitations of our study. We did not measure total BA in cholestatic liver homogenates, however, based on the previous work by Naito *et al.* [35] we can assume that similar concentrations of BA exist both in plasma and the liver. Secondly, only a short-term BDL was performed in our study, therefore, we cannot speculate about the course of chronic cholestasis. To clarify the exact role of HO expression in cholestasis, further studies with HO-1 knockout animals should be performed.

We conclude that high concentrations of BA in cholestasis are responsible for increased lipid peroxidation in the liver. In contrast, bilirubin has an antioxidative effect and is responsible for increased antioxidant capacity of cholestatic plasma. However, in the liver, BA maintain relatively low intracellular bilirubin levels. Therefore, the increase in BA/bilirubin ratio might be implicated in the pathogenesis of oxidative stress-mediated cholestatic liver injury.

## Acknowledgements

We thank Professor Ulrich Beuers from University of Amsterdam for providing us with HepG2-rNtcp cells, Iva Subhanova for determination of mRNA in cell cultures, Olga Svejda for excellent technical assistance and Iveta Mrázová for microsurgical ligation of bile ducts in rats. This work was supported by grant IGA MZ NR/9366–3 from the Czech Ministry of Health.

## Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

## References

- Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis*. 2000; 4: 357–85.
- Roma MG, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EA. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci*. 2008; 114: 567–88.
- Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005; 54: 1024–33.
- Maher JJ, Friedman SL. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. *Semin Liver Dis*. 1993; 13: 13–20.
- Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, et al. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res*. 2001; 49: 519–31.
- Fuentes-Brato L, Martinez-Ballarin E, Miana-Mena J, et al. Lipid and protein oxidation in hepatic homogenates and cell membranes exposed to bile acids. *Free Radic Res*. 2009; 43: 1080–9.
- Sokol RJ, Winkhofer-Reob BM, Devereaux MW, et al. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology*. 1995; 109: 1249–56.
- Moran M, Oruc MT, Ozmen MM, et al. Effect of Erythropoietin on Oxidative Stress and Liver Injury in Experimental Obstructive Jaundice. *Eur Surg Res*. 2009; 43: 228–34.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987; 235: 1043–6.
- Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, et al. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19: 395–404.
- Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1\*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 1–11.
- Ollinger R, Yamashita K, Bilban M, et al. Bilirubin and biliverdin treatment of atherosclerotic diseases. *Cell Cycle*. 2007; 6: 39–43.
- Bulmer AC, Blanchfield JT, Toth I, et al. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: a mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis*. 2008; 199: 390–6.
- Ollinger R, Kogler P, Troppmair J, et al. Bilirubin inhibits tumor cell growth via activation of ERK. *Cell Cycle*. 2007; 6: 3078–85.
- Zucker SD, Horn PS, Sherman KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology*. 2004; 40: 827–35.
- Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem*. 2007; 43: 1–57.
- McDonagh AF, Assisi F. The ready isomerization of bilirubin IX $\alpha$  in aqueous solution. *Biochem J*. 1972; 129: 797–800.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, et al. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg*. 2004; 17: 99–104.
- Iuliano L, Piccheri C, Coppola I, et al. Fluorescence quenching of dipyrromethane associated to peroxyl radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1474: 177–82.
- Zelenka J, Lenicek M, Muchova L, et al. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2008; 867: 37–42.
- Maines MD. Current protocols in toxicology. New York: John Wiley; 1998.
- Vreman HJ, Wong RJ, Kadotani T, et al. Determination of carbon monoxide (CO) in rodent tissue: effect of heme administration and environmental CO exposure. *Anal Biochem*. 2005; 341: 280–9.
- Vreman HJ, Kwong LK, Stevenson DK. Carbon monoxide in blood: an improved microliter blood-sample collection system, with rapid analysis by gas chromatography. *Clin Chem*. 1984; 30: 1382–6.
- Vreman HJ, Wong RJ, Sanesi CA, et al. Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998; 76: 1057–65.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Kubitz R, et al. Stable expression and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology*. 2000; 34: 1–9.
- Kotal P, Van der Veere CN, Sinaasappel M, et al. Intestinal excretion of unconjugated bilirubin in man and rats with inherited unconjugated hyperbilirubinemia. *Pediatr Res*. 1997; 42: 195–200.
- Wolff DG. The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 73: 850–7.
- Granato A, Gores G, Vilei MT, et al. Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes. *Gut*. 2003; 52: 1774–8.
- Zelenka J, Muchova L, Vitek L. The role of heme oxygenase-1 induction and intracellular metabolism of bilirubin in response to oxidative stress. *Hepatology*. 2008; 48: 1124a.
- Dumont M, Jacquemin E, D'Hont C, et al. Expression of the liver Na<sup>+</sup>-independent organic anion transporting polypeptide (oatp-1) in rats with bile duct ligation. *J Hepatol*. 1997; 27: 1051–6.
- Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, et al. Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22: 885–92.
- Huang LT, Tiao MM, Tain YL, et al. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res*. 2009; 65: 176–80.
- Muchova L, Wong RJ, Hsu M, et al. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of *in vivo* antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85: 800–10.
- Naite T, Kureki S, Chijiwa K, et al. Bile acid synthesis and biliary hydrophobicity during obstructive jaundice in rats. *J Surg Res*. 1996; 65: 70–6.
- Mediavilla MG, Pascolo L, Rodriguez JV, et al. Uptake of [(3)H]bilirubin in freshly isolated rat hepatocytes: role of free bilirubin concentration. *FEBS Lett*. 1999; 463: 143–5.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, et al. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773: 283–308.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, et al. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 16093–8.
- Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26: 1223–33.

## 8.5. Příloha 5

Šmíd V, Petr T, Váňová K, Jašprová J, Šuk J, Vítek L, Šmíd F, Muchová L. Changes in liver ganglioside metabolism in obstructive cholestasis– the role of oxidative stress.

**Folia Biologica** 2016; 62:148-159.



## Original Article

# Changes in Liver Ganglioside Metabolism in Obstructive Cholestasis – the Role of Oxidative Stress

(cholestasis / gangliosides / haem oxygenase / liver)

V. ŠMÍD<sup>1,2</sup>, T. PETR<sup>1</sup>, K. VÁŇOVÁ<sup>1</sup>, J. JAŠPROVÁ<sup>1</sup>, J. ŠUK<sup>1</sup>, L. VÍTEK<sup>1,2</sup>, F. ŠMÍD<sup>1</sup>, L. MUCHOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, <sup>2</sup>4<sup>th</sup> Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

**Abstract.** Bile acids have been implicated in cholestatic liver damage, primarily due to their detergent effect on membranes and induction of oxidative stress. Gangliosides can counteract these harmful effects by increasing the rigidity of the cytoplasmic membrane. Induction of haem oxygenase (HMOX) has been shown to protect the liver from increased oxidative stress. The aim of this study was to determine the changes in the synthesis and distribution of liver gangliosides following bile duct ligation (BDL), and

to assess the effects of HMOX both on cholestatic liver injury and ganglioside metabolism. Compared to controls, BDL resulted in a significant increase in total as well as complex gangliosides and mRNA expression of corresponding glycosyltransferases ST3GalV, ST8SiaI and B3GalTIV. A marked shift of GM1 ganglioside from the intracellular compartment to the cytoplasmic membrane was observed following BDL. Induction of oxidative stress by HMOX inhibition resulted in a further increase of these changes, while HMOX induction prevented this effect. Compared to BDL alone, HMOX inhibition in combination with BDL significantly increased the amount of bile infarcts, while HMOX activation decreased ductular proliferation. We have demonstrated that cholestasis is accompanied by significant changes in the distribution and synthesis of liver gangliosides. HMOX induction results in attenuation of the cholestatic pattern of liver gangliosides, while HMOX inhibition leads to the opposite effect.

Received March 29, 2016. Accepted April 14, 2016.

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA MZ 11327-4 and RVO-VFN64165/2016), and by grants from Charles University in Prague, Czech Republic (GAUK 516912 and SVV 260032-2015).

Corresponding author: Lucie Muchová, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Kateřinská 32, 121 08 Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 224 964 199; Fax: (+420) 224 962 532; e-mail: lucie.muchova@lf1.cuni.cz

Abbreviations: aBDL – BDL with HMOX activation, aC – control with HMOX activation, ALP – alkaline phosphatase, ALT – alanine aminotransferase, AST – aspartate aminotransferase, B3GalTIV – UDP-Gal:βGlcNAc β 1,3-galactosyltransferase, B4GalNTI – β-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1, BA – bile acids, BDL – bile duct ligation, BSA – bovine serum albumin, C – control, cAMP, cyclic adenosine monophosphate, CO – carbon monoxide, CTB – cholera toxin B-subunit, EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid, EE – 17α-ethinyl oestradiol, FW – fresh weight, GalTI – UDP-Gal:βGlcNAc β 1,4-galactosyltransferase, GlcT – UDP-glucose ceramide glucosyltransferase, GSL – glycosphingolipids, HMOX – haem oxygenase, iBDL – BDL with HMOX inhibition, iC – control with HMOX inhibition, PBS – phosphate-buffered saline, ROS – reactive oxygen species, SnMP – tin-mesoporphyrin, ST3GalV – ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 5, ST8SiaI – ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 1, TBA – total bile acids. GSL are abbreviated according to the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Chester, 1998)

## Introduction

Cholestasis is an impairment of bile secretion and/or flow, followed by a lack of bile in the intestine and accumulation of potentially toxic bile acids (BA) in the liver and systemic circulation (Paumgartner, 2006). A major consequence of cholestasis is development of severe liver injury due to rapid accumulation of BA within the hepatocytes (Gujral et al., 2003). It is generally assumed that the exposure of hepatocytes to high concentrations of potentially toxic BA is primarily responsible for cholestatic liver injury (Perez and Briz, 2009). The molecular mechanisms behind early liver injury associated with cholestasis have been extensively studied, but are still not well understood (Woolbright and Jaeschke, 2012). BA act as an inflammation agent, directly activating the signalling pathways in hepatocytes that regulate production of proinflammatory mediators (Allen et al., 2011). Recent data support the hypothesis that cholestatic liver injury may not occur through direct BA-induced apoptosis, but may mainly involve inflammatory cell-

*Folia Biologica (Praha)* 62, 148-159 (2016)

mediated liver cell necrosis (Woolbright and Jaeschke, 2012).

Equally, amphipathic BA could disrupt cell membranes and cause structural and/or functional damage of the hepatocyte membrane through their detergent action on lipid components (Billington et al., 1980). Another mechanism for the development of cholestatic liver injury arises from ultrastructural changes such as altered cell polarity, disruption of cell-to-cell junctions, cytoskeletal changes, and membrane fluidity (Trauner et al., 1999).

More than 30 years ago, decreased fluidity of the cytoplasmic membrane in erythrocytes of patients with intrahepatic cholestasis (Balistreri et al., 1981), as well as in the livers of mice with intrahepatic cholestasis (Boelsterli et al., 1983), was described. Changes in the membrane cholesterol and sphingomyelin contents were at least partially responsible for these changes (Smith and Gordon, 1988).

It is known that cholesterol-(glyco)sphingolipid (GSL) complexes, tightly packed in a liquid ordered state (Munro, 2003; Rajendran and Simons, 2005), called lipid rafts, are needed to protect the membranes against the detergent effect/action of BA (Guyot and Stieger, 2011).

Gangliosides, forming a major part of GSL, are assembled from a lipophilic ceramide portion plus a structurally variable hydrophilic oligosaccharide portion containing N-acetylneuraminic acid. They are highly concentrated in the outer layer of the plasmatic membrane, and thanks to their unique physical and chemical properties, they are considered crucial molecules responsible for the rigidity of plasmatic membranes (Pascher, 1976; Pascher et al., 1992).

The possible relationship between decreased membrane fluidity and changes in the content and localization of GSL in intrahepatic cholestasis was recently investigated by our group (Jirkovska et al., 2007). Based on this study, the redistribution of gangliosides on the sinusoidal membrane of the hepatocyte seems to be a

protective mechanism of hepatocytes against the harmful effects of BA accumulated during ethinyl oestradiol (EE)-induced cholestasis. A significant increase of total lipid sialic acid – the hallmark of ganglioside content – together with a high increase of gangliosides synthesized in the so-called *b*-biosynthetic pathway (Fig. 1) was found in EE-induced cholestasis in rats (Majer et al., 2007). These results suggest that changes in the localization and content of gangliosides may serve as a protective mechanism against cholestatic liver injury.

Moreover, our recent data also indicate that the changes and redistribution of gangliosides during experimental EE-induced cholestasis are attributable to high concentrations of accumulated BA (Jirkovska et al., 2007), as well as increased oxidative stress (Petr et al., 2014) in the EE-induced cholestasis model. One of the important anti-oxidant and anti-inflammatory factors is haem oxygenase (HMOX; E.C. 1:14:99:3). HMOX catalyses the rate-limiting step in the oxidative degradation of haem, converting it into biliverdin IX $\alpha$  and subsequently to bilirubin IX $\alpha$  by biliverdin reductase (E.C. 1:3:1:24), carbon monoxide, and iron. HMOX plays a key role in the cellular and tissue defences against oxidative stress (Poss and Tonegawa, 1997). Up-regulation of its inducible isoenzyme HMOX-1 has been shown to protect the liver from toxic, inflammatory, and oxidative insults. Recently, we have shown that BA are potent inhibitors of HMOX activity and expression (Muchova et al., 2011). The decreased HMOX activity in the cholestatic liver causes relative depletion of intracellular bilirubin, a potent endogenous antioxidant (Vitek et al., 2002). The relative lack of this intracellular antioxidant together with high levels of pro-oxidative BA participates in the pathogenesis of oxidative stress-mediated liver injury. In addition, we reported the anticholestatic effect of HMOX induction (Muchova et al., 2015) as well as restoration of the changes in the synthesis and distribution of gangliosides in EE-induced cholestasis (Petr et al., 2014).

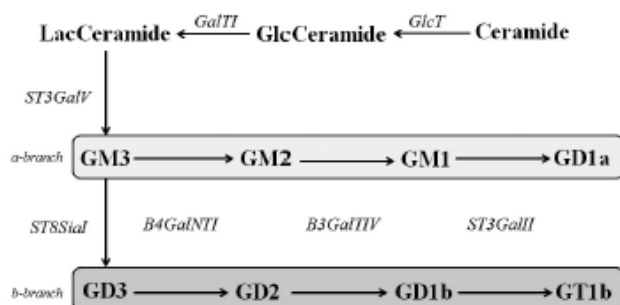


Fig. 1. Scheme of *de novo* biosynthesis of the oligosaccharide moieties of gangliosides

*GlcT* – UDP-glucose ceramide glucosyltransferase, *GalTI* – UDP-Gal:βGlcNAc β 1,4-galactosyltransferase, *ST3GalV* – ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 5, *ST8SiaI* – ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 1, *B4GalNTI* – β-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1, *B3GalTIV* – UDP-Gal:βGlcNAc β 1,3-galactosyltransferase, *ST3GalII* – ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 2.



The aim of the present study was to determine changes in the synthesis and distribution of liver gangliosides following bile duct ligation (BDL), and to assess the effect of the modulation of HMOX activity both on cholestatic liver injury and on ganglioside metabolism.

## Material and Methods

### Materials

Paraformaldehyde, hemin, biotin, bovine serum albumin (BSA) and diaminobenzidine tetrahydrochloride tablets were supplied by Sigma (St. Louis, MO); avidin was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); the cholera toxin B-subunit (CTB) peroxidase conjugated came from List Biological Laboratories (Campbell, CA). The tin-mesoporphyrin was supplied by Frontier Scientific (Logan, UT). All other chemicals were purchased locally from Penta (Prague, Czech Republic). The TaqMan® Gene Expression Master Mix, High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, the TaqMan® Gene Expression Assay kit for rat genes were obtained from Life Technologies (Carlsbad, CA). The QIAshredder kit and RNEasy Plus MiniKit were supplied by Qiagen (Valencia, CA).

### Animals and treatments

Female Wistar rats (Anlab, Prague, Czech Republic) were housed under controlled temperature and a natural light-dark cycle. The animals had free access to food and water throughout the experiments, and were fasted overnight prior to the experiment initiation. All aspects of the study met the accepted criteria for the experimental use of laboratory animals, and all protocols were approved by the Animal Research Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic.

### Cholestasis induction

Rats intraperitoneally anaesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) underwent ligation or a sham operation. Cholestasis was induced in three groups of rats ( $N = 8$  per group) by microsurgical ligation of segmental bile ducts and resection of the extrahepatic biliary tract ("BDL") (Aller et al., 2004). Biliary trees were exposed through midline abdominal incision. The control group of rats ( $N = 6$ ) was sham-operated (controls, "C").

### HMOX modulation

HMOX was inhibited by a bolus of tin-mesoporphyrin (SnMP) 15  $\mu$ M/kg administered intraperitoneally on day 1 ("iBDL", BDL with HMOX inhibition; "iC", control with HMOX inhibition) (George et al., 2013; Porter et al., 2009). Induction of HMOX was performed by a bolus of hemin 30  $\mu$ M/kg given intraperitoneally on day 0 and day 3 ("aBDL", BDL with HMOX activation; "aC", control with HMOX activation), (Ndisang et al., 2010; Zhong et al., 2010; Muchova et al., 2015).

### Tissue preparation

After five days, the inferior vena cava was cannulated through laparotomy, and blood samples were collected (5 ml), transferred to EDTA-containing tubes, mixed, and placed on ice. An aliquot was centrifuged to separate out the plasma. The livers were then harvested and weighed. Pieces of liver tissue were appropriately processed for further biochemical and histochemical analyses (see below). For quantitative histochemical analysis of GM1 ganglioside, the liver specimens were collected using a systematic uniform random sampling method (Hamilton, 1995).

For RNA analysis, 100 mg of tissue was immediately placed in 1.5 ml microfuge tubes containing RNeasy Lysate (Qiagen). The tubes were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until total RNA isolation.

For HMOX activity, HMOX protein, and lipid peroxidation measurements, 100–150 mg of tissue was diluted 1:9 (by weight) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH = 7.4), diced, and sonicated with an ultrasonic cell disruptor (Model XL2000, Misonics, Farmingdale, NY). Sonicates were kept on ice and assayed for HMOX activity within 1 hr, or frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of the HMOX protein.

### Analysis of plasma markers of cholestasis

In order to determine the degree of cholestasis and liver injury, the following plasma levels were assessed: total bile acids (TBA), total bilirubin, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). TBA were determined spectrophotometrically using a Bile Acids Kit (Trinity Biotech, Jamestown, NY), while all other markers were quantified in an automatic analyser (Model 717, Hitachi, Tokyo).

### HMOX activity measurement

Twenty  $\mu$ l of 10% liver sonicate (2 mg fresh weight [FW]) was incubated for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in carbon monoxide (CO)-free septum-sealed vials containing 20  $\mu$ l of 150  $\mu$ M methemalbumin and 20  $\mu$ l of 4.5 mM NADPH as previously described (Vreman et al., 1999). Blank reaction vials contained 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) in place of NADPH. Reactions were terminated by adding 5  $\mu$ l of 30% (w/v) sulphosalicylic acid. The amount of CO generated by the reaction and released into the vial headspace was quantitated by gas chromatography with a reduction gas analyser (Trace Analytical, Menlo Park, CA). HMOX activity was calculated as pmol CO/hr/mg FW.

### Isolation and TLC analysis of liver gangliosides

Gangliosides were isolated using the procedure previously described (Majer et al., 2007) and finally purified on a small silica gel column (Yu and Ledeen, 1972). Gangliosides were separated in a solvent system (chloroform/methanol/0.2% aqueous  $\text{CaCl}_2$ , 55/45/10, v/v/v), and detected with resorcinol-HCl reagent. Densitometry

was performed according to Majer et al. (2007). Part of the extract was used for determination of the total sialic acid (total gangliosides) by the photometric method with resorcinol reagent (Svennerholm, 1957).

#### Light microscopy

Small tissue blocks (about 1 cm<sup>3</sup>) were fixed in 4% paraformaldehyde followed by the standard procedure for paraffin embedding. Serial sections were cut and stained with haematoxylin and eosin. Each slide was viewed using standard light microscopy.

#### GM1 histochemistry

GM1 was determined using a modified procedure according to Jirkovska et al. (2007). In brief, 4% formaldehyde was freshly prepared by depolymerization of paraformaldehyde (pH = 7.2). Frozen 6 µm thin sections were first fixed in dry cold acetone (-20 °C) for 15 min, and then in 4% freshly prepared paraformaldehyde for 5 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation for 15 min in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.1% sodium azide. Endogenous biotin was blocked by means of a DakoCytomation blocking kit (DakoCytomation, Denmark). In order to block nonspecific binding, sections were treated with 3% BSA in PBS for 15 min. GM1 ganglioside in liver sections was detected using CTB biotin labelled (Sigma), diluted 1 : 300 in PBS, plus 3% BSA at 8 °C for 16.5 h, followed with streptavidin-peroxidase polymer at room temperature for 1 h. Peroxidase activity was visualized with diaminobenzidine tetrahydrochloride for 20 min in the dark. Sections were mounted in DAKO S3025 (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA). Two negative control tests were performed for each group. First, CTB was omitted in immunohistochemical staining. Second, fixed sections were extracted with chloroform:methanol 2 : 1 at room temperature for 30 min, followed by standard immunohistochemical staining.

#### Quantitative study of the distribution of GM1 ganglioside in the hepatic lobule

Six liver specimens were used for the experiment. One section of each specimen was used for GM1 ganglioside detection with CTB. In each section, four hepatic lobules with a clearly discernible central vein were selected. In each lobule, one measuring frame in lobular zone II (approximately) was selected for the analysis. The haematoxylin and eosin counterstaining was omitted.

The images of whole sections were photographed at the objective magnification of 40× (NA = 0.12) and stored. The quantity of the reaction product was determined as the mean optical brightness/density of the marked area using the ACC 6.0 image analysis program (SOFO, Brno, Czech Republic). Two different ways were used for quantification. First, the whole section was marked and its mean optical brightness was evaluated.

Second, areas of liver parenchyma in the intermediate (zone II) of the hepatic lobules were marked, and their mean optical brightness was determined separately.

#### Densitometric analysis of GM1 ganglioside in sinusoidal membrane and adjacent cytoplasm areas

Six liver specimens were used from each animal. One section from each specimen was used for GM1 ganglioside detection as described above. In each section, four hepatic lobules with a clearly discernible central vein were selected. In each lobule, one measuring frame in the central lobular zone III and one measuring frame in the corresponding peripheral lobular zone I were selected for analysis. In each frame, 15 areas of sinusoidal surface and 15 areas of adjacent hepatocyte cytoplasm were selected by the stratified random sampling method (Hamilton, 1995) and marked out. The reaction product was quantified as the mean optical density of the analysed areas (determined by the densitometric program ACC 6.0, SOFO) at objective magnification of 40× (NA = 0.7). The ratios of densities measured in the sinusoidal membrane and subsinusoidal intracellular compartment were measured and compared (sin/int).

#### Quantitative real-time PCR

The liver samples were stored frozen at -80 °C in RNAlater (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), and total RNA was isolated using a Qiagen RNeasy plus kit and QIA shredder (Qiagen). A High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to generate cDNA. Quantitative real-time PCR was performed using a TaqMan® Gene Expression Assay Kit (Life Technologies) for the following genes: *GlcT* (Rn00582480\_m1), *GalT1* (Rn00581985\_m1), *ST3GalV* (Rn01420866\_m1), *ST8Sial* (Rn00563093\_m1), *B4GalNT1* (Rn00575768\_m1), *B3GalTIV* (Rn01429268\_s1), and  $\beta$ -actin endogenous control kit (Rn00667869\_m1), all provided by Life Technologies. The data were normalized to  $\beta$ -actin and expressed as percent of control levels.

#### Statistical analysis

Normally distributed data are presented as the mean  $\pm$  SD and analysed by the Student's *t*-test. Medians (25–75%) and the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test were used in skewed data. Differences with *P* < 0.05 were considered significant.

## Results

#### Induction of cholestasis by BDL

As expected, BDL for five days resulted in a significant increase in plasma cholestatic markers, alkaline phosphatase (ALP) activity, as well as BA and bilirubin concentrations (Table 1). Modulation of HMOX activity had no effect on plasma BA levels, while HMOX activation by hemin led to a significant decrease in ALP activity.



Table 1. The effect of BDL on cholestatic markers, and liver and body weight

Group	Body weight [g]	Liver weight [g]	TBA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Bilirubin [ $\mu\text{mol/l}$ ]	ALP [ $\mu\text{kat/l}$ ]	HMOX activity [ $\mu\text{mol CO/hr/mg FW}$ ]
C (N = 6)	235.5 $\pm$ 9.0	10.4 $\pm$ 0.7	17.3 $\pm$ 9.2	1.4 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.3	327.7 $\pm$ 48.0
BDL (N = 8)	224.7 $\pm$ 16.0	14.5 $\pm$ 1.8*	372.0 $\pm$ 132.3*	320.5 $\pm$ 74.0*	4.4 $\pm$ 0.3*	199.4 $\pm$ 37.0*
iBDL (N = 8)	209.3 $\pm$ 11.0	13.3 $\pm$ 1.9	612.6 $\pm$ 164.1**	215.4 $\pm$ 47.0**	3.5 $\pm$ 0.9*	59.3 $\pm$ 7.0**
aBDL (N = 8)	218.9 $\pm$ 26.0	15.5* $\pm$ 1.7	638.4 $\pm$ 188.2**	291.3 $\pm$ 38.1*	3.3 $\pm$ 0.5**	640.6 $\pm$ 123.0**

Cholestatic markers, and liver and body weight in Wistar rats 5 days after surgery. C – control, CO – carbon monoxide, FW – fresh weight. \* –  $P < 0.05$  vs. C; \*\* –  $P < 0.05$  vs. BDL.

ity (BDL vs. aBDL,  $P < 0.05$ ). Generally, plasma bilirubin levels were substantially affected by its decreased elimination in cholestasis as well as by the changes in its production following induction/inhibition of HMOX. Accordingly, we observed a significant increase in plasma bilirubin levels in all cholestatic groups compared to controls. However, HMOX inhibition in the iBDL group resulted in a significantly lower plasma bilirubin increase compared to the BDL and aBDL groups (Table 1). Compared to controls, BDL, iBDL and aBDL also led to a significant increase in AST activity, a marker of liver injury (data not shown).

The effect of HMOX modulators on enzyme activity was verified by gas chromatography (Table 1). As expected, inhibition of HMOX activity was achieved in the iBDL group, while its increase was detected following HMOX activation in the aBDL group. A significant decrease in HMOX activity was observed in the BDL group compared to controls.

BDL had no effect on the total body weight of the experimental animals. A 15% drop in total body weight was only observed in the iBDL group compared to the controls (Table 1). By contrast, significant increases in

liver weight were recorded in all BDL animals compared to the controls.

#### Modulation of HMOX activity affects ductular proliferation and biliary infarction in obstructive cholestasis

BDL led to typical morphological features of obstructive jaundice in the liver tissue. The histopathological changes included: portal tract expansion, ductular proliferation (mainly in periportal areas), and interlobular bile duct elongation with dilated lumina and irregular epithelium. The surrounding portal tract tissue was oedematous and infiltrated by nonaggressive inflammatory infiltrate, predominantly with neutrophils. Signs of hepatocellular degeneration were observed – feathery degeneration with flocculent cytoplasm and ballooning with swollen hepatocytes. Variable amounts of intracellular bile pigments and focal signs of necrosis with increased hepatocyte regeneration were observed in all BDL rats. Giant cell transformation with coalescence of hepatocytes, multiple nuclei, and free-floating canaliculi were present.

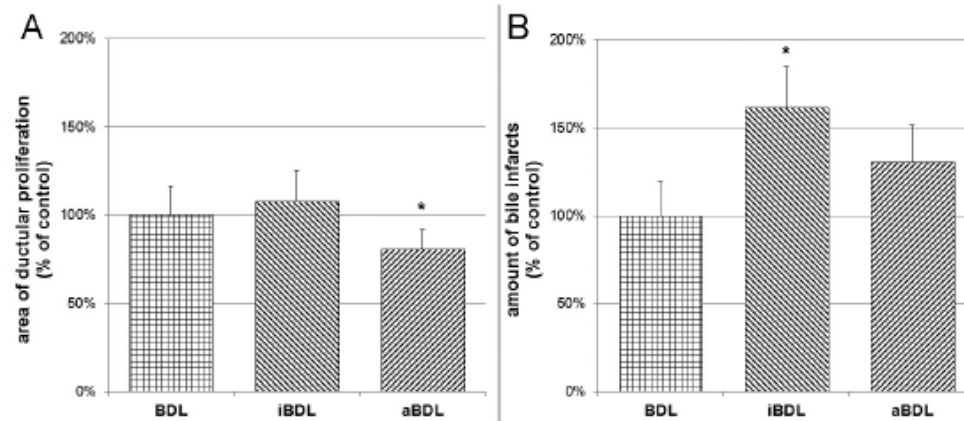


Fig. 2. Area of liver ductular proliferation and number of bile infarcts

A. Area of ductular proliferation in the liver sections of BDL animals. B. Number of bile infarcts in liver sections of BDL animals.

Liver sections stained with haematoxylin and eosin were analysed using a systematic uniform random sampling method. Results are expressed as % of controls. \* –  $P < 0.05$  vs. BDL.

HMOX activation resulted in a significant decrease in ductular proliferation (to  $83 \pm 9\%$ ,  $P < 0.05$ ), while HMOX inhibition had no effect on ductular proliferation compared to BDL animals (Fig. 2A).

BDL rats developed a typical biliary type of liver cell hepatocyte necrosis with typical bile infarcts. The average number of bile infarcts in BDL rats was 0.43 infarcts per liver section. Inhibition of HMOX significantly increased the amount of bile infarcts compared to BDL controls ( $0.43 \pm 0.11$  vs.  $0.71 \pm 0.09$  infarcts per liver section,  $P < 0.005$ ). In contrast, no effect was observed upon HMOX activation ( $0.43 \pm 0.11$  vs.  $0.57 \pm 0.1$  infarcts per section,  $P > 0.05$ ; Fig. 2B).

#### BDL and HMOX modulation leads to changes in ganglioside content and spectra

Total lipid sialic acid concentration, a marker of total ganglioside content, was significantly higher in the livers of BDL animals compared to controls ( $100 \pm 20\%$  vs.  $153 \pm 15\%$ ,  $P < 0.001$ ). Inhibition of HMOX activity by SnMP resulted in a further increase in total lipid sialic acid content ( $298 \pm 22\%$ ,  $P < 0.001$ ). Unfortunately, due to haem interference, we were not able to measure the sialic acid content in the livers of hemin-treated animals (Table 2).

Next, we analysed the hepatic ganglioside spectra of both *a*- and *b*-biosynthetic pathways (Fig. 3A, 3B and Table 3). While the predominant ganglioside was determined to be GM3 in the control livers, GD1a and GD1b were the major gangliosides in the cholestatic livers. Interestingly, HMOX inhibition led to an increase of GM3 ganglioside, while HMOX activation resulted in significant decreases in the liver content of the *b*-series of gangliosides GD1b and GT1b compared to the BDL group (Table 3). Furthermore, obstructive cholestasis was accompanied by a significant increase in the liver

ganglioside content, as determined both by thin layer chromatography (Fig. 3A, 3B) and spectrophotometrically as total sialic acid concentration (Table 2). This increase was most pronounced following HMOX inhibition, whereas a tendency to decrease was observed following HMOX activation (Fig. 3A). BDL led to a significant increase in the total amount of di- and tri-sialogangliosides. In contrast, activation of HMOX led to a significant decrease in these complex gangliosides (Fig. 3B).

#### Changes in the mRNA expression of the key enzymes of ganglioside metabolism during BDL

To elucidate the biochemical basis of the observed differences in the ganglioside content spectra, we measured the expression of key enzymes involved in ganglioside synthesis – *GlcT*, *GalT*, *ST3GalV*, *ST8SiaI*, *B4GalNTI* and *B3GalTIV*.

BDL led to a significant increase in *ST3GalV* mRNA expression compared to controls ( $197 \pm 30\%$ ,  $P < 0.05$ ), (Fig. 4C), and was even more pronounced in iBDL.

Inhibition of HMOX also resulted in a significant increase in *GalT* ( $186 \pm 22\%$ ,  $P < 0.001$ ), *ST3GalV* ( $371 \pm 105\%$ ,  $P < 0.001$ ), *ST8SiaI* ( $185 \pm 44\%$ ,  $P < 0.05$ ), and *B3GalTIV* ( $150 \pm 25\%$ ,  $P < 0.05$ ) mRNA expression compared to the control. The effect of HMOX inhibition in the iBDL group observed as overexpression of *ST3GalV* and *ST8SiaI* was also significant compared to the BDL group (Fig. 4). These results are consistent with the results of TLC ganglioside analysis.

HMOX induction resulted in a significant decrease of *B3GalTIV* expression ( $68 \pm 11\%$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 4F). Furthermore, a significant drop in *ST3GalV* mRNA expression was observed in the aBDL group when compared to BDL alone.

Table 2. The effect of BDL on total sialic acid concentrations in the liver tissue

Group	C (N = 6)	BDL (N = 8)	iC (N = 6)	iBDL (N = 8)	aC (N = 6)	aBDL (N = 8)
Total sialic acid [nmol/g liver]	17.3 ± 3.5	26.5* ± 3.9	29.3* ± 1.6	51.6** ± 6.2	N.D.	N.D.

Total sialic acid (total gangliosides) concentrations in the liver tissue of Wistar rats 5 days after surgery was measured by the spectrophotometric method with resorcinol reagent. BDL as well as HMOX inhibition led to a significant increase in total sialic acid content. C – control, N.D. – not determined due to haem interference. \* –  $P < 0.05$  vs. C; \*\* –  $P < 0.05$  vs. BDL.

Table 3. The effect of BDL on the total amount of gangliosides of the *a*- and *b*-branches in the liver tissue

Group	<i>a</i> -Branch [nmol/g liver]			<i>b</i> -Branch [nmol/g liver]		
	GM3	GM1	GD1a	GD3	GD1b	GT1b
C (N = 6)	2.5 ± 0.9	1.01 ± 0.30	2.01 ± 1.40	1.43 ± 0.50	1.04 ± 0.40	0.62 ± 0.20
BDL (N = 8)	2.62 ± 1.10	1.60 ± 0.40*	5.1 ± 1.3*	1.42 ± 0.30	2.86 ± 0.70*	1.49 ± 0.40*
iBDL (N = 8)	3.69 ± 0.70**	1.91 ± 0.40*	5.89 ± 1.50*	1.85 ± 0.50*	1.81 ± 0.30*	0.91 ± 0.50
aBDL (N = 8)	3.45 ± 1.20	1.83 ± 0.30*	4.31 ± 0.90*	1.49 ± 0.50	1.47 ± 0.40†	0.92 ± 0.20†

Isolated gangliosides were separated in a solvent system and detected with resorcinol-HCl reagent (nmol/g) with subsequent densitometric analysis. BDL led to a significant increase of terminal gangliosides of the *a*- (GD1a and GM1) as well as *b*-branch (GD1b and GT1b).

C – control, \* –  $P < 0.05$  vs. C; † –  $P < 0.05$  vs. BDL.

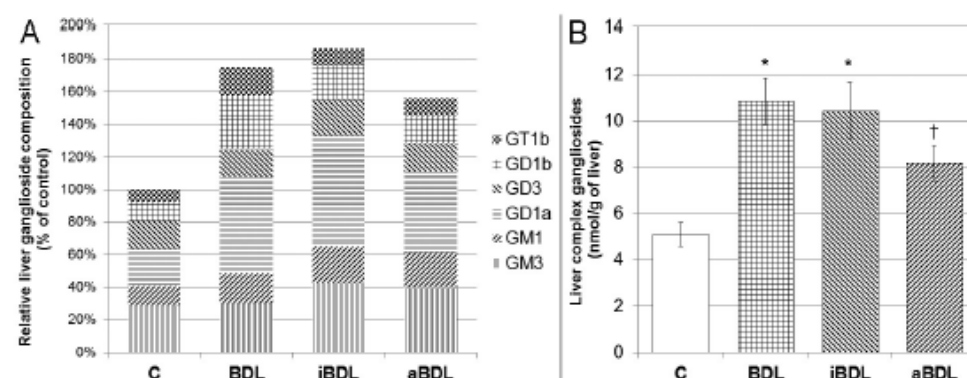


Fig. 3. Effect of BDL on the ganglioside content in the liver

A. Relative amount of gangliosides of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -branches in the liver tissue of the control and BDL animals. Isolated gangliosides were separated in a solvent system and detected with resorcinol-HCl reagent, with subsequent densitometric analysis. Results are expressed as % of controls. B. Total amount of di- and trisialogangliosides (GD3, GD1, GD1b and GT1b) in the liver tissue of BDL animals.

C – control, \* –  $P < 0.05$  vs. C, † –  $P < 0.05$  vs. BDL

#### *The shift of GM1 ganglioside to the cytoplasmic membrane during cholestasis is affected by HMOX modulation*

Under physiological conditions, the GM1 ganglioside is distributed in both the sinusoidal and canalicular hepatocyte membranes, with strong intracellular localization in all lobular zones in the liver sections of the control animals. The same pattern was observed in the control livers with HMOX modulation (iC and aC), indicating no effect of HMOX modulation on ganglioside distribution within the liver cell under physiological conditions.

However, a marked shift of GM1 positivity from the intracellular compartment to the hepatocyte membrane (predominantly sinusoidal) was observed after BDL ( $P < 0.01$ , Figs. 5 and 6).

Interestingly, HMOX inhibition in BDL animals resulted in an even more pronounced shift of GM1 to the sinusoidal membrane (iBDL vs. BDL;  $P < 0.05$ , Fig. 5), whereas no shift of GM1 from the intracellular compartment was observed following HMOX induction in BDL rats, resulting in a similar immunohistological pattern as in the control group (Figs. 5 and 6).

#### Discussion

In the present study, we showed that cholestasis induced by BDL is accompanied by significant changes both in the distribution and synthesis of the liver gangliosides. Moreover, simultaneous induction of the hepatoprotective and anti-cholestatic HMOX enzyme resulted in attenuation of the cholestatic pattern of liver gangliosides.

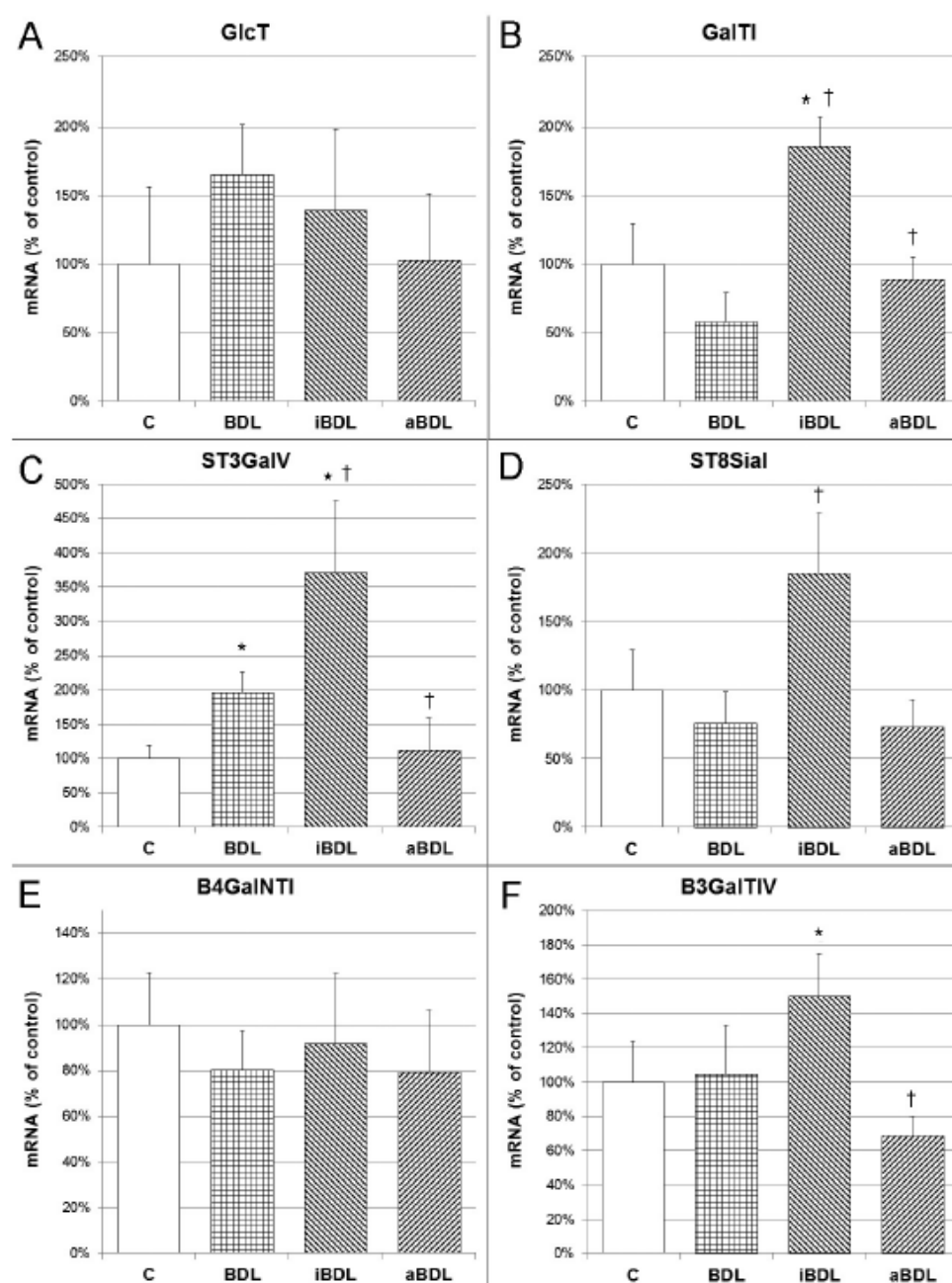
Even though gangliosides are considered key structural as well as functional parts of the lipid bilayer, and changes in their chemical composition and cellular con-

centration might have deleterious consequences (d'Azzo et al., 2006), their pathophysiological significance in the liver tissue needs to be elucidated (Sanchez et al., 2000). Altered ganglioside patterns have been reported in cirrhosis and hepatocellular carcinoma in human livers (Tanno et al., 1988) as well as in biliary cirrhosis in the rat (Senn et al., 1991). A different distribution of ganglioside synthases in hepatocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells was observed in the rat (Senn et al., 1990). Moreover, our group has demonstrated an altered ganglioside pattern in the livers of rats with EE-induced cholestasis (Jirkovska et al., 2007), and its improvement following HMOX induction by haem (Petr et al., 2014; Muchova et al., 2015).

BDL in rats is used as a model of severe obstructive cholestasis in humans. This disease is characterized by interruption of bile flow, followed by a rapid increase in the plasma levels of BA, conjugated bilirubin, and ALP activity.

As expected, BDL was followed by a severe biochemical as well as histological cholestatic pattern. In accordance with our recent data (Muchova et al., 2011), we observed a decrease in liver HMOX activity as a consequence of the inhibitory effect of high plasma and liver concentrations of BA. In contrast to the study on intrahepatic cholestasis (Muchova et al., 2015), HMOX induction with hemin did not lead to improvement in the plasma cholestatic markers. This might be explained by the different mechanisms of the intrahepatic and obstructive cholestasis. While the primary cause of intrahepatic cholestasis is impaired bile flow due to the changes in hepatocyte transporter expression (Trauer et al., 1997), which might be restored by the effect of haem, the biliary tree obstruction is primarily due to a mechanical obstacle followed by secondary changes in the expression of liver transporters.





**Fig. 4.** Effect of BDL on mRNA expression of key enzymes in ganglioside synthesis in the liver  
The relative mRNA expression of key glycosyltransferases in ganglioside synthesis was measured in the liver tissue. Results are expressed as % of controls. C – control, \* –  $P < 0.05$  vs. C, † –  $P < 0.05$  vs. BDL

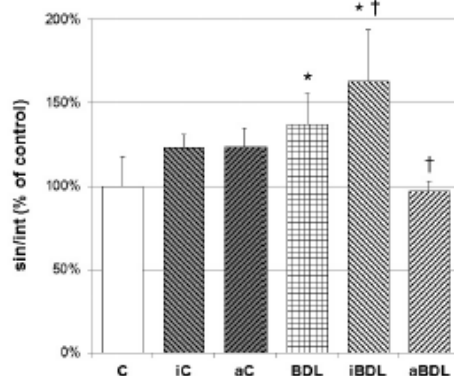


Fig. 5. Distribution of GM1 ganglioside in cholestatic livers. Image analysis of the intensity of GM1 ganglioside staining in the subsinusoidal part of the intracellular compartment (int) and sinusoidal membranes (sin) of hepatocytes, expressed as the sin/int ratio. Results are expressed as % of controls. C – control, \* –  $P < 0.05$  vs. C, † –  $P < 0.05$  vs. BDL.

A significant decrease in ductular proliferation, the hallmark of obstructive cholestasis, was observed in the liver sections of BDL animals with HMOX induction. Cholangiocytes are mitotically dormant in the normal liver, but start to proliferate upon cholangiopathies including BDL (Glaser et al., 2000; Munshi et al., 2011). Two main signalling pathways are involved in cholangiocyte proliferation, the inositol 1,4,5-trisphosphate/ $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathway and cAMP (Alpini et al., 1998). Interestingly, both of these pathways were found to be regulated by gangliosides in different cell culture models (Ravichandra and Joshi, 1999; Kanda et al., 2001).

Moreover, in our study, a significant increase in complex gangliosides (containing at least two sialic acid residues linked to lactosylceramide) was detected in the liver of BDL animals, as well as those with HMOX inhibition compared to controls. In contrast, HMOX activation resulted in a decrease in liver complex gangliosides when compared with BDL without HMOX modulation. Importantly, a completely different role has been attributed to complex versus monosialyl gangliosides in cellular proliferation and differentiation. While monosialyl gangliosides have an anti-proliferative effect, complex gangliosides enhance cell growth and proliferation (Furukawa et al., 2012), indicating that gangliosides might possess an important regulatory role in ductular proliferation in the cholestatic liver. The proliferation of ductules is a logical response of the liver to BA accumulation, which augment the hepatic bile clearance capacity. However, in the case of obstructive cholestasis, these changes are ineffective (the cause of biliary obstruction lies in the common bile duct) and as a consequence, it could have a destructive effect on the liver

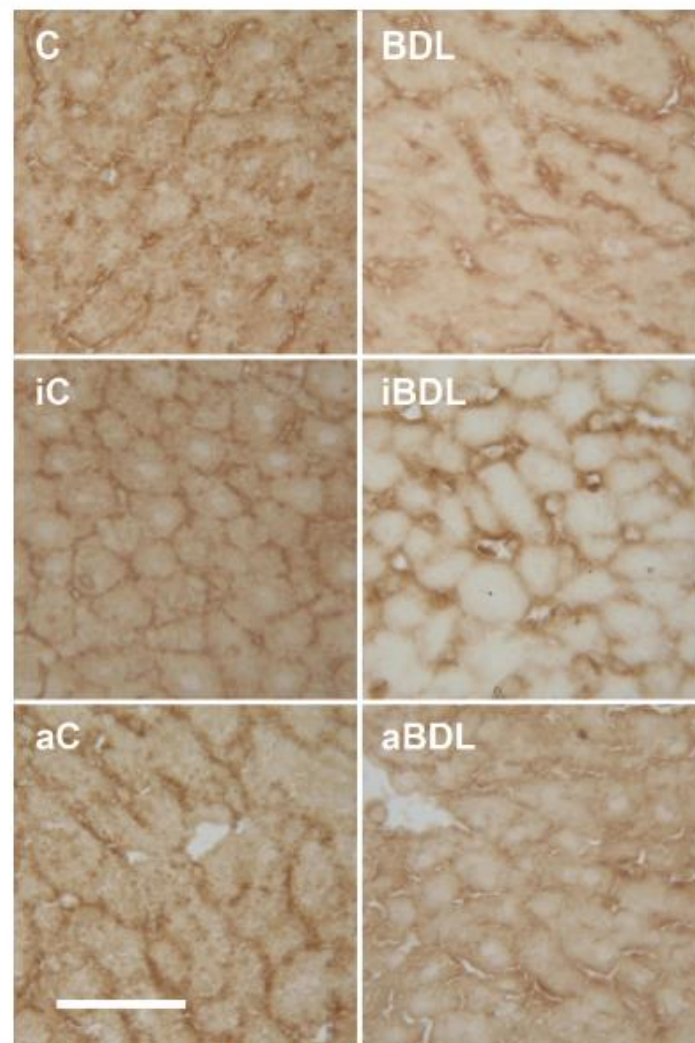
parenchyma by replacing the functional hepatocytes by ineffective tissue. In this case, decreasing oxidative stress by hemin administration in cholestasis has a hepatoprotective effect.

The effect of BDL and HMOX modulation on ganglioside synthesis was further supported by determination of mRNA expression of the key enzymes of the ganglioside biosynthesis pathway. BDL animals showed increased *ST3GalV* expression, corresponding to the overall increased ganglioside production from lactosylceramide. HMOX inhibition resulted in a further increase in *ST3GalV*, with simultaneous elevations in *ST8SiaI* and *B3GalTIV*, representing activation of the *b*-branch and terminal gangliosides, respectively. On the other hand, HMOX activation returned the expression of all enzymes to control values. These findings correspond well with the liver ganglioside content as measured by total sialic acid concentrations in the liver, as well as ganglioside spectra in control and cholestatic livers with/without modulation of HMOX.

The accumulation of BA inside hepatocytes is the major cause of cholestatic liver damage (Kullak-Ublick and Meier, 2000), including structural and functional injuries of hepatocyte membranes (Roma et al., 2008), cell death, and activation of inflammatory and fibrogenic signalling pathways (Maher and Friedman, 1993; Muchova et al., 2011). BA may disrupt cell membranes through their detergent action on lipid components and promote generation of ROS, which in turn oxidatively modify lipids, proteins, and nucleic acids; eventually causing hepatocyte necrosis and apoptosis (Perez and Briz, 2009). Recently, it was reported that the canalicular part of the hepatocyte membrane contains detergent-resistant microdomains – lipid rafts – enriched in GSL, including gangliosides, sphingomyelin, and cholesterol, protecting this part of the hepatocyte membrane against the detergent action of BA (Nourissat et al., 2008). There is no doubt that these rafts also exist on the sinusoidal part of the hepatocyte membrane (Zegers and Hoekstra, 1998). Gangliosides as molecules with a high melting point, rigid structure, and highly stable sialic acids are key raft components, responsible for their physical properties.

Recently, Jirkovska et al. (2007) described redistribution of gangliosides within hepatocytes in EE-induced cholestasis. Similarly, in the present study we have shown the shift of the GM1 ganglioside from the intracellular compartment to the sinusoidal membrane of the hepatocyte in cholestatic animals, supporting the concept of a protective effect of gangliosides against the deleterious effect of high plasma levels of BA. Interestingly, this shift was even more pronounced in BDL with HMOX inhibition, while HMOX induction prevented GM1 trafficking to membranes. A similar effect of HMOX induction on ganglioside redistribution was observed by our group (Petr et al., 2014) in the model of EE-induced cholestasis related to reduction of oxidative stress.

We conclude that obstructive cholestasis is accompanied by an increase in the content and synthesis of liver



**Fig. 6.** Localization of GM1 ganglioside in cholestatic livers

In the liver sections, GM1 ganglioside was detected using the cholera toxin B-subunit with streptavidin-peroxidase polymer. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (brown colour) was used for visualization. A significant shift of GM1 positivity from the cytoplasm to the sinusoidal membranes was observed after BDL. HMOX inhibition in iBDL animals resulted in an even more pronounced shift of GM1 from the cytoplasm to the sinusoidal membrane, whereas HMOX activation in the aBDL group had the opposite effect. Modulation of HMOX alone in iC and aC had no effect on GM1 localization. C – control. Bar represents 50  $\mu$ m.

gangliosides followed by their shift into the sinusoidal membranes. This mechanism can protect hepatocytes against the deleterious effect of high systemic concentrations of BA, and also activate proliferation of biliary epithelia. Moreover, the inhibition of antioxidant and hepatoprotective enzyme HMOX in BDL animals further potentiates these changes, while its activation has

the opposite effect, indicating the important role of BA-induced oxidative stress in the liver ganglioside metabolism. These results might have potential therapeutic implications, since many drugs and natural products exhibit HMOX-inducing activities (Bach, 2005), and thus might serve as hepatoprotectants.



## Acknowledgement

We wish to thank Marie Zadinová for her help with the animal experiments, Helena Hůlková and Marie Jirkovská for their help with histology of liver sections, and Jaroslava Šmidová and Olga Švejsová for their excellent technical assistance.

## References

- Allen, K., Jaeschke, H., Copple, B. L. (2011) Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am. J. Pathol.* 178, 175-186.
- Aller, M. A., Nava, M. P., Arias, J. L., Duran, M., Prieto, I., Llamas, M. A., Arias, J. (2004) Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J. Invest. Surg.* 17, 99-104.
- Alpini, G., Glaser, S. S., Ueno, Y., Pham, L., Podila, P. V., Caligiuri, A., LeSage, G., LaRusso, N. F. (1998) Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am. J. Physiol.* 274, G767-775.
- Bach, F. H. (2005) Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *FASEB J.* 19, 1216-1219.
- Balistreri, W. F., Leslie, M. H., Cooper, R. A. (1981) Increased cholesterol and decreased fluidity of red cell membranes (spur cell anemia) in progressive intrahepatic cholestasis. *Pediatrics* 67, 461-466.
- Billington, D., Evans, C. E., Godfrey, P. P., Coleman, R. (1980) Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 188, 321-327.
- Boelsterli, U. A., Rakhit, G., Balazs, T. (1983) Modulation by S-adenosyl-L-methionine of hepatic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, membrane fluidity, and bile flow in rats with ethinyl estradiol-induced cholestasis. *Hepatology* 3, 12-17.
- Chester, M. A. (1998) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids - recommendations 1997. *Eur. J. Biochem.* 257, 293-298.
- d'Azzo, A., Tessitore, A., Sano, R. (2006) Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response. *Cell. Death Differ.* 13, 404-414.
- Furukawa, K., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Hamamura, K., Ohmi, Y. (2012) Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J. Biochem.* 151, 573-578.
- George, E. M., Hosick, P. A., Stec, D. E., Granger, J. P. (2013) Heme oxygenase inhibition increases blood pressure in pregnant rats. *Am. J. Hypertens.* 26, 924-930.
- Glaser, S., Benedetti, A., Marucci, L., Alvaro, D., Baiocchi, L., Kanno, N., Caligiuri, A., Phinzy, J. L., Chowdhury, U., Papa, E., LeSage, G., Alpini, G. (2000) Gastrin inhibits cholangiocyte growth in bile duct-ligated rats by interaction with cholecystokinin-B/gastrin receptors via D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate-, Ca<sup>2+</sup>-, and protein kinase C-dependent mechanisms. *Hepatology* 32, 17-25.
- Gujral, J. S., Farhood, A., Bajt, M. L., Jaeschke, H. (2003) Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 38, 355-363.
- Guyot, C., Stieger, B. (2011) Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains. *J. Hepatol.* 55, 1368-1376.
- Hamilton, P. W. (1995) Designing a morphometric study. In: Hamilton, P. W., Allen, D. C., *Quantitative Clinical Pathology*. Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Jurkowska, M., Majer, F., Smidová, J., Stritesky, J., Shaik, G. M., Draber, P., Vitek, L., Marecek, Z., Smid, F. (2007) Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. *Glycoconj. J.* 24, 231-241.
- Kanda, N., Nakai, K., Watanabe, S. (2001) Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production: the inhibition of adenylate cyclase. *J. Invest. Dermatol.* 117, 284-293.
- Kullak-Ublick, G. A., Meier, P. J. (2000) Mechanisms of cholestasis. *Clin. Liver Dis.* 4, 357-385.
- Maher, J. J., Friedman, S. L. (1993) Parenchymal and non-parenchymal cell interactions in the liver. *Semin. Liver Dis.* 13, 13-20.
- Majer, F., Trnka, L., Vitek, L., Jurkowska, M., Marecek, Z., Smid, F. (2007) Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver. *Biomed. Chromatogr.* 21, 446-450.
- Muchova, L., Vanova, K., Zelenka, J., Lenicek, M., Petr, T., Vejrazka, M., Sticova, E., Vreman, H. J., Wong, R. J., Vitek, L. (2011) Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1156-1165.
- Muchova, L., Vanova, K., Suk, J., Micuda, S., Dolezelova, E., Fuksa, L., Cerny, D., Farghali, H., Zelenkova, M., Lenicek, M., Wong, R. J., Vreman, H. J., Vitek, L. (2015) Protective effect of heme oxygenase induction in ethinylestradiol-induced cholestasis. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 924-933.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- Munshi, M. K., Priester, S., Gaudio, E., Yang, F., Alpini, G., Mancinelli, R., Wise, C., Meng, F., Franchitto, A., Onori, P., Glaser, S. S. (2011) Regulation of biliary proliferation by neuroendocrine factors: implications for the pathogenesis of cholestatic liver diseases. *Am. J. Pathol.* 178, 472-484.
- Ndisang, J. F., Lane, N., Syed, N., Jadhav, A. (2010) Up-regulating the heme oxygenase system with hemin improves insulin sensitivity and glucose metabolism in adult spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 151, 549-560.
- Nourissat, P., Travert, M., Chevanne, M., Tekpli, X., Rebillard, A., Le Moigne-Muller, G., Rissel, M., Cillard, J., Dimanche-Boitrel, M. T., Lagadic-Gossmann, D., Sergeant, O. (2008) Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology* 47, 59-70.
- Pascher, I. (1976) Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 433-451.
- Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm, P. G., Sundell, S. (1992) Crystal structures of membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 339-373.

- Paumgartner, G. (2006) Medical treatment of cholestatic liver diseases: from pathobiology to pharmacological targets. *World J. Gastroenterol.* 12, 4445-4451.
- Perez, M. J., Briz, O. (2009) Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J. Gastroenterol.* 15, 1677-1689.
- Petr, T., Smid, V., Kucerova, V., Vanova, K., Lenicek, M., Vitek, L., Smid, F., Muchova, L. (2014) The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis. *Physiol. Res.* 63, 359-367.
- Porteri, E., Rodella, L. F., Rezzani, R., Rizzoni, D., Paiardi, S., de Ciuceis, C., Boari, G. E., Foglio, E., Favero, G., Rizzardi, N., Platto, C., Agabiti Rosei, E. (2009) Role of heme oxygenase in modulating endothelial function in mesenteric small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 31, 560-571.
- Poss, K. D., Tonegawa, S. (1997) Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10925-10930.
- Rajendran, L., Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell. Sci.* 118, 1099-1102.
- Ravichandra, B., Joshi, P. G. (1999) Regulation of transmembrane signaling by ganglioside GM1: interaction of anti-GM1 with Neuro2a cells. *J. Neurochem.* 73, 557-567.
- Roma, M. G., Crocenzi, F. A., Sanchez Pozzi, E. A. (2008) Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin. Sci. (Lond)* 114, 567-588.
- Sanchez, S. S., Abregu, A. V., Aybar, M. J., Sanchez Riera, A. N. (2000) Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biol. Int.* 24, 897-904.
- Senn, H. J., Orth, M., Fitzke, E., Scholmerich, J., Koster, W., Wieland, H., Gerok, W. (1990) Altered concentrations, patterns and distribution in lipoproteins of serum gangliosides in liver diseases of different etiologies. *J. Hepatol.* 11, 290-296.
- Senn, H. J., Geiser, T., Fitzke, E., Baumgartner, U., Scholmerich, J., Gerok, W. (1991) Altered biosynthesis of gangliosides in developing biliary cirrhosis in the rat. *J. Hepatol.* 13, 152-160.
- Smith, D. J., Gordon, E. R. (1988) Role of liver plasma membrane fluidity in the pathogenesis of estrogen-induced cholestasis. *J. Lab. Clin. Med.* 112, 679-685.
- Svennerholm, L. (1957) Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604-611.
- Tanno, M., Yamada, H., Shimada, H., Ohashi, M. (1988) Ganglioside variations in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma as shown by two-dimensional thin-layer chromatography. *Clin. Biochem.* 21, 333-339.
- Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C. J., Ananthanarayanan, M., Koepfel, T. A., Schlosser, S. F., Suchy, F. J., Keppler, D., Boyer, J. L. (1997) The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113, 255-264.
- Trauner, M., Meier, P. J., Boyer, J. L. (1999) Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J. Hepatol.* 31, 165-178.
- Vitek, L., Jursa, M., Brodanova, M., Kalab, M., Marecek, Z., Danzig, V., Novotny, L., Kotal, P. (2002) Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 160, 449-456.
- Vreman, H. J., Wong, R. J., Harmatz, P., Fanaroff, A. A., Berman, B., Stevenson, D. K. (1999) Validation of the Natus CO-Stat End Tidal Breath Analyzer in children and adults. *J. Clin. Monit. Comput.* 15, 421-427.
- Woolbright, B. L., Jaeschke, H. (2012) Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World J. Gastroenterol.* 18, 4985-4993.
- Yu, R. K., Ledeen, R. W. (1972) Gangliosides of human, bovine, and rabbit plasma. *J. Lipid Res.* 13, 680-686.
- Zegers, M. M., Hoekstra, D. (1998) Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.* 336 (Pt 2), 257-269.
- Zhong, W., Xia, Z., Hinrichs, D., Rosenbaum, J. T., Wegmann, K. W., Meyrowitz, J., Zhang, Z. (2010) Hemin exerts multiple protective mechanisms and attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 50, 132-139.



## **9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ**

### **9.1. Publikace týkající se tématu disertační práce**

**9.1.1.** Šmíd V, Petr T, Váňová K, Jašprová J, Šuk J, Vítek L, Šmíd F, Muchová L. Changes in liver ganglioside metabolism in obstructive cholestasis– the role of oxidative stress.

**Folia Biologica 2016;** 62:148-159.

**IF= 0,833**

**9.1.2.** Petr T, Smíd V, Kučerová V, Váňová K, Leníček M, Vítek L, Smíd F, Muchová L. The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis.

**Physiological Research 2014;** 63(3):359–67.

**IF= 1,293**

**9.1.3.** Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, Sticova E, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress.

**Journal of Cellular and Molecular Medicine 2011;** 15(5):1156-65.doi:10.1111/j.1582 - 4934.2010.01098.x

**IF= 4,125**

**9.1.4.** Petr T, Smíd V, Smídová J, Hůlková H, Jirkovská M, Elleder M, Muchová L, Vitek L, Smíd F. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction.

**European Journal of Histochemistry 2010;** 12;54(2):e23.

**IF= 1,809**

**9.1.5.** Smíd F, Ledvinová J, Petr T, Smídová J, Vitek L. Methods Based on Binding Affinity of the B-Subunit of Cholera Toxin to Gangliosides in Biochemistry and Histology (kapitola v knize)

**Cholera: Symptoms, Diagnosis and Treatment**, Editor: Evelyn L. Melbourne, ISBN: 978-1-61761-789-8, © 2010 Nova Science Publishers, Inc.)

## **9.2. Publikace týkající se jiných témat**

**9.2.1.** Kaválková P, Mraz M, Trachta P, Kloučková J, Cinkajzlová A, Lacinova Z, Haluzíková D, Beneš M, Vlasáková Z, Burda V, Novák D, Petr T, Vitek L, Pelikánová T, Haluzik M. Endocrine effects of duodenal-jejunal exclusion in obese patients with type 2 diabetes mellitus.

**The Journal of Endocrinology 2016;** Jul 29. pii: JOE-16-0206. **IF= 4,498**

**9.2.2.** Broz P, Rajdl D, Racek J, Petr T, Vitek L. Two cases of spuriously elevated cerebrospinal glucose concentration.

**Annals of Clinical Biochemistry 2015;** Jan;52(Pt 1):161-4. doi: 10.1177/0004563214547284. **IF= 2,119**

**9.2.3.** Vanova K, Suk J, Petr T, Cerny D, Slanar O, Vreman HJ, Wong RJ, Zima T, Vitek L, Muchova L. Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics.

**Biochimie 2014;** Feb;97:173-80. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.009. **IF= 2,963**

**9.2.4.** Haluzíková D, Lacinová Z, Kaválková P, Drápalová J, Křížová J, Bártlová M, Mráz M, Petr T, Vitek L, Kasalický M, Haluzík M. Laparoscopic sleeve gastrectomy differentially affects serum concentrations of FGF-19 and FGF-21 in morbidly obese subjects.

**Obesity** 2013; Jul;21(7):1335-42. doi: 10.1002/oby.20208.

**IF= 4,389**